

# Funktionen und Regulation der PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

04.Juni 2009

vorgelegt von  
Sabahat Işın Ertongur  
aus Ankara

angefertigt am  
Helmholtz Zentrum München  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

1. Gutachter: PD Dr. Berit Jungnickel

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2009

Bu tezi aileme armağan ediyorum.

Gewidmet meiner Familie.

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden wie folgt veröffentlicht:

Bachl, J., Ertongur, I., and Jungnickel, B. (2006). **Involvement of Rad18 in somatic hypermutation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12081-12086.

**Ubc13-dosage is relevant for immunoglobulin gene conversion and gene targeting in vertebrates.** Ertongur, I., Kutzera, A., Fischer-Burkart, S., Arakawa, H. and Jungnickel, B. (Manuskript in Vorbereitung)

Die Arbeit wurde auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

Summer School "Molecular Interactions during Infection" in Quedlinburg, 2006 (Poster)  
„Interact“ PhD Symposium in Martinsried, 2007 (Poster)

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	5
2	Zusammenfassung.....	9
3	Einleitung.....	10
	3.1 DNA-Schäden und Reparatur.....	10
	3.1.1 Basenexzisionsreparatur.....	10
	3.1.2 Nukleotidexzisionsreparatur.....	11
	3.1.3 <i>Mismatch</i> -Reparatur.....	12
	3.1.4 DNA-Doppelstrangbruchreparatur: NHEJ und HR.....	12
	3.1.5 Postreplikationsreparatur.....	15
	3.2 Der Rad6-Weg.....	16
	3.2.1 Fehlerhafter Pfad des Rad6-Weges: Transläsionssynthese.....	17
	3.2.2 Fehlerfreier Pfad des Rad6-Weges.....	17
	3.2.3 Ubiquitinierung und das E2-Enzym Ubc13.....	18
	3.3 Das Immunsystem von Vertebraten.....	19
	3.3.1 Kurze Einführung in das Immunsystem.....	19
	3.3.2 Genetische Vielfalt des Immunsystems.....	20
	3.3.3 Antigen-abhängige Diversifikation des Antikörper-Repertoires von Mensch und Maus.....	22
	3.3.4 Besonderheiten der Antigen-abhängigen Diversifikation im Huhn.....	24
	3.4 Zielsetzung.....	26
4	Ergebnisse.....	27
	4.1 Aktivität der PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten.....	27
	4.1.1 Etablierung von PCNA-Ubiquitinierungsassays.....	27
	4.1.2 Rolle von Rad18 bei der Ubiquitinierung von PCNA.....	30
	4.1.3 Weitere Untersuchungen zur PCNA-Modifikation.....	31
	4.1.3.1 Ko-Immunopräzipitation in DT40-Zellen.....	31
	4.1.3.2 Vergleichende Ubiquitinierungsassays mit der DT40-Mutante PCNA <sup>K164R</sup> .....	33
	4.2 Analysen zu potentiellen Regulationswegen der PCNA-Ubiquitinierung und der Ubc13-Level.....	34
	4.2.1 PCNA-Ubiquitinierung in humanen Zelllinien mit unterschiedlichem Hypermutationspotential und p53-Status.....	35
	4.2.2 PCNA-Ubiquitinierung in p53 <sup>+/+</sup> und p53 <sup>-/-</sup> HCT-116-Zellen.....	36

---

4.2.3	Untersuchungen zur Regulation von Ubc13 in Vertebraten .....	38
4.2.3.1	Versuche zur Induzierbarkeit von Ubc13 durch MMS .....	38
4.2.3.2	Versuche zur Induzierbarkeit von Ubc13 durch AID .....	39
4.2.4	Untersuchungen zur Korrelation der SHM mit der Expression von Ubc13, Rad18 und Rad6 .....	40
4.3	Funktionelle Analyse von Ubc13 bei der Ig-Diversifizierung in DT40-Zellen....	42
4.3.1	Inaktivierung eines Ubc13-Allels in DT40Cre1-Zellen.....	42
4.3.2	Rolle von Ubc13 bei der Ig-Genkonversion .....	45
4.3.3	Einfluss von Ubc13 auf Proliferation und DNA-Reparatur .....	49
4.3.4	Inaktivierung eines Ubc13-Allels in DT40 $\Psi$ AID <sup>R</sup> -Zellen.....	52
4.3.5	Einfluss von Ubc13 auf die somatische Hypermutation .....	54
4.3.6	Beeinflussung der gerichteten Integration durch Ubc13-Level .....	56
5	Diskussion .....	58
5.1	Analyse der PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten .....	58
5.1.1	PCNA-Ubiquitinierung in DT40-Zellen .....	59
5.1.2	Rad18-abhängige PCNA-Monoubiquitinierung .....	60
5.1.3	Untersuchungen höhermolekularer PCNA-Modifikationen .....	62
5.2	Potentielle Regulationswege von PCNA-Ubiquitinierung und Ubc13 in Vertebraten.....	64
5.2.1	Untersuchungen zur Regulation der PCNA-Ubiquitinierung .....	64
5.2.2	Untersuchungen zur potentiellen Regulation von Ubc13 sowie anderen Mitgliedern des Rad6-Weges .....	66
5.3	Rolle von Ubc13 bei Ig-Diversifizierungsprozessen in Vertebraten .....	68
5.3.1	Untersuchungen der Ig-Genkonversion nach Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in DT40Cre1-Zellen.....	68
5.3.2	Rolle von Ubc13 bei Proliferation und DNA-Reparatur.....	71
5.3.3	Untersuchungen der somatischen Hypermutation nach Inaktivierung eines Ubc13-Allels in DT40 $\Psi$ V <sup>-/-</sup> AID <sup>R</sup> Zellen .....	73
5.3.4	Beeinflussung der gerichteten Integration durch Ubc13-Level .....	76
5.4	Ausblick .....	77
6	Materialien & Methoden .....	78
6.1	Materialien .....	78
6.1.1	Chemikalien .....	78
6.1.2	Kits .....	78

---

6.1.3	Geräte .....	78
6.1.4	Datenverarbeitung .....	79
6.1.5	Größenmarker .....	79
6.1.5.1	DNA-Größenstandard .....	79
6.1.5.2	Protein-Größenstandard .....	79
6.1.6	Enzyme .....	79
6.1.7	Bakterien .....	80
6.1.8	Plasmide .....	80
6.1.9	Zelllinien .....	81
6.1.10	Oligonukleotide .....	82
6.1.11	Antikörper .....	83
6.2	Methoden .....	83
6.2.1	Standardmethoden .....	83
6.2.2	Zellkulturbedingungen .....	83
6.2.3	Bestimmung der Zelldichte .....	84
6.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	84
6.2.5	Transfektion von DT40-Zellen .....	85
6.2.5.1	Vorbereitung der Zellen und der Plasmid-DNA .....	85
6.2.5.2	Transfektion und Generierung von DT40-Einzelzellklonen .....	85
6.2.6	MACS-Separation .....	86
6.2.6.1	Ig-Genkonversionsassays und SHM-Assays im DT40-System .....	87
6.2.7	FACS-Analyse .....	87
6.2.8	PCNA-Ubiquitinierungsassays .....	88
6.2.9	Proliferationsassay .....	89
6.2.10	Methylzellulose-Überlebensassay .....	90
6.3	Techniken der DNA-Analyse .....	91
6.3.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	91
6.3.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	91
6.3.3	Photometrische DNA-Quantifizierung .....	91
6.3.4	DNA-Gelelektrophorese .....	92
6.3.5	Reinigung der DNA .....	92
6.3.6	Direktisolierung von DNA .....	92
6.3.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	93
6.3.8	Klonierungstechnik .....	93

---

6.3.8.1	Ubc13-Überexpressionsvektor und Ubc13- <i>targeting</i> Vektoren .....	93
6.3.8.2	pGEMT-Klonierung des VJ-Bereichs von DT40-EZK .....	93
6.3.9	Southern-Blot .....	94
6.3.10	DNA-Sequenzierungen .....	95
6.4	Proteinbiochemische Methoden .....	95
6.4.1	Präparation von Proteinen aus Zellen.....	95
6.4.2	Proteinquantifizierung.....	96
6.4.3	SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	96
6.4.4	Western-Blot .....	97
6.4.5	Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern.....	98
7	Anhang .....	99
7.1	Abkürzungen .....	99
7.2	Tabellenverzeichnis.....	101
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	102
7.4	Danksagung.....	103
7.5	Ehrenwörtliche Versicherung.....	105
7.6	Erklärung.....	106
7.7	Lebenslauf.....	107
7.8	Literaturverzeichnis.....	108



## 2 Zusammenfassung

In Vertebraten entsteht durch Somatische Hypermutation (SHM) und Immunglobulin-Genkonversion (Ig-GC) eine große Vielfalt an Antikörpern, die eine bestmögliche Abwehr von Pathogenen im Körper gewährleisten. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Rad6-Weg bei der Regulierung der SHM eine entscheidende Rolle spielt. Der Rad6-Weg ist für die Überwindung von replikationsassoziierten DNA-Läsionen zuständig. Dies kann in Vertebraten über einen potentiell fehlerhaften Weg, unter Beteiligung von Rad6/Rad18, oder vorwiegend fehlerfreien Weg, über Mms2/Ubc13 und SHPRH bzw. HLTF, erfolgen. Die Art der Reparatur wird dabei durch den Ubiquitinierungsstatus der Plattform PCNA gesteuert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, in wieweit die Funktionen von Mitgliedern des Rad6-Weges, und hier insbesondere Ubc13, in Vertebraten konserviert sind und zusätzlich zu ihrer bekannten Funktion einen Beitrag zur Ig-Diversifizierung in Vertebraten leisten können.

Ubiquitinierungsassays konnten belegen, dass Rad18 auch in Vertebraten als Ubiquitinligase zur PCNA-Monoubiquitinierung beiträgt, dass es daneben aber eine zusätzliche Ubiquitinligase geben muss, die diese Aufgabe bei Bedarf übernehmen kann. Untersuchungen zu potentiellen Regulationswegen der PCNA-Ubiquitinierung konnten keine direkte Korrelation des Hypermutationspotentials oder p53-Status einzelner Zelllinien mit dem Anteil an induzierter PCNA-Ubiquitinierung aufzeigen. Auch gab es keine Hinweise auf eine Regulation der Expression von einzelnen Mitgliedern des Rad6-Weges.

Experimente zur Rolle von Ubc13 bei Prozessen zur Ig-Diversifizierung haben ergeben, dass die Ubc13-Dosis für die Rate an Ig-GC in DT40-Zellen von zentraler Bedeutung ist. So zeigten Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen, mit einem reduzierten Ubc13-Anteil eine signifikante Verringerung des Anteils an Ig-GC. SHM-Assays konnten zudem klären, dass diese verringerte Rate aber nicht durch eine erhöhte SHM-Rate von Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen kompensiert wird. AID-generierte Läsionen, die bei beiden Prozessen der Ig-Diversifizierung entstehen, scheinen bei einer verringerten Ubc13-Dosis überwiegend fehlerfrei durch NHEJ repariert zu werden, so dass der Anteil an Mutationen im Genom nicht erhöht wird.

Damit konnte für Ubc13 eine zusätzliche, neue Funktion bei der Regulation der Ig-GC aufgezeigt werden, die im Verlauf der Evolution in höheren Spezies entstanden sein muss. Es bleibt abzuwarten, ob durch zukünftige Experimente mit den jüngst entdeckten E3-Ligasen die mit Ubc13 in Vertebraten interagieren können, eine Rolle des fehlerfreien Pfades des Rad6-Weges bei der Regulation der SHM aufgezeigt werden kann.

## 3 Einleitung

### 3.1 DNA-Schäden und Reparatur

---

DNA wird ständig durch Umweltfaktoren wie z.B. UV oder radioaktive Strahlung sowie durch mutagene Chemikalien geschädigt (Lindahl, 1993). Aber auch endogene Prozesse, die im täglichen Zellmetabolismus stattfinden, können zu hoch reaktiven Stoffwechselprodukten führen, die unsere DNA spontan schädigen können (Finkel und Holbrook, 2000; Hoeijmakers, 2001).

Um die genetische Integrität zu gewährleisten gibt es daher eine Vielzahl von Reparaturmechanismen, die je nach Art des Schadens zum Einsatz kommen und dafür sorgen, dass die Anzahl an Mutationen im Genom möglichst gering gehalten wird. Diese werden über ein Netzwerk (*dna damage response network*) koordiniert, das auch für die Kontrolle des Zellzyklus, der Replikation sowie des Zelltods zuständig ist (Friedberg, 2008; Hoeijmakers, 2001; Rai et al., 2007). Im Folgenden werden die wichtigsten DNA-Reparaturwege in Vertebraten näher erläutert.

#### 3.1.1 Basenexzisionsreparatur

Die Basenexzisionsreparatur (BER) ist ein wichtiger Reparaturweg, um spontan auftretende DNA-Schäden die nur einen DNA-Strang betreffen, wie z.B. Methylierung, oxidative Schäden oder Deaminierung, zu reparieren. Der Reparaturprozess besteht aus drei verschiedenen Schritten: Zunächst werden die fehlerhaften Basen durch den Einsatz verschiedener Glykosylasen, wie z.B. *uracil-DNA glycosylase* (UNG) oder *8-oxoguanine DNA glycosylase* (OGG) entfernt, so dass abasische Stellen in der DNA entstehen. Dort können in einem zweiten Schritt durch Endonukleasen wie z.B. *AP endonuclease* (APE), Einzelstrangbrüche eingeführt werden. Die dabei entstehenden Lücken in der DNA können über die beiden Hauptwege der BER - *short-patch repair* oder *long-patch repair* - repariert werden. Die Wahl des Reparaturweges wird über mehrere Faktoren wie z.B. die Art des Schadens, die Aktivierung der Glykosylasen oder die Zellzyklusphase der Zellen beeinflusst. Beim *short-patch repair* sind XRCC1, Polymerase  $\beta$ , und Ligase 3 beteiligt, während die Reparatur über *long-patch repair* im Wesentlichen durch PCNA, Polymerase  $\epsilon$

oder  $\delta$ , Endonuklease FEN1 und die Ligase1 erfolgt (Fortini und Dogliotti, 2007; Hazra et al., 2007).

Menschen mit Mutationen im MUTYH-Protein, das zur Erkennung von oxidativen DNA-Schäden bei der BER benötigt wird, weisen ein erhöhtes Risiko für Colorektalkrebs auf (Farrington et al., 2005). Der Verlust der Hauptproteine dieses Reparaturweges führte außerdem in Modellversuchen mit Mäusen zu Tod im Embryonalstadium, was die Bedeutsamkeit der BER für die Reparatur von spontanen DNA-Schäden aufzeigt (Lindahl und Wood, 1999; Robertson et al., 1997).

### 3.1.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist für die Reparatur von DNA-Schäden zuständig, die mehrere Basen betreffen oder die zu größeren DNA-Konformationsänderungen führen. Man unterscheidet dabei die globale NER, die durch den Komplex XPC-hHR23B für die Erkennung von Läsionen auf dem gesamten Genom zuständig ist, von der Transkriptionsgekoppelten-NER, die durch die beiden Proteine CSB und CSA auf Schäden spezialisiert ist, die das Voranschreiten von RNA-Polymerasen verhindern können. Die auf diesen ersten Erkennungsschritt folgenden Phasen verlaufen für beide NER-Mechanismen in ähnlicher Form, und können den Proteinen der XP-Familie (*Xeroderma pigmentosum*) zugeordnet werden (Costa et al., 2003). Die beiden Helikasen XPB und XPD öffnen mit etwa 30 Basenpaaren Abstand zum Schaden die DNA, so dass die beiden Endonukleasen XPG und ERCC1/XPF diesen Bereich auf dem geschädigten Strang entfernen können. Der ungeschädigte Strang wird dabei durch RPA stabilisiert. Die dadurch entstandene Lücke wird durch die normale Replikationsmaschinerie wieder aufgefüllt (Batty et al., 2000; de Laat et al., 1999).

Es sind bisher drei verschiedene Krankheiten beim Mensch bekannt, die auf einen Defekt der NER zurückzuführen sind: *Xeroderma pigmentosum*, *Cockayne syndrome* und *Trichothiodystrophy*. Diese Krankheiten sind durch eine starke Sensitivität gegen UV-Strahlung sowie eine Prädisposition für Hautkrebs oder frühzeitige Hautalterungserscheinungen charakterisiert (Berneburg und Lehmann, 2001; Bootsma et al., 1995).

### 3.1.3 Mismatch-Reparatur

Die Mismatch-Reparatur (MMR) ist für die Reparatur fehlgepaarter Basen, Insertionen und Deletionen verantwortlich, die vor allem bei der Replikation repetitiver Sequenzen oder durch fehlerhafte Rekombination entstanden sind. Dabei sind Homologe der MutS- und MutL-Familie aus *E. coli* involviert. Der Prozess kann in vier verschiedene Schritte eingeteilt werden: Erkennung der Fehlpaarung durch hMSH2/6 bzw. im Fall von Insertionen/Deletionen durch hMSH2/3, die Rekrutierung zusätzlicher Faktoren der MMR wie hMutL $\alpha$  und hMutL $\beta$ , die Exzision der fehlerhaften Stelle sowie schließlich die Resynthese des entfernten Bereichs unter Beteiligung von Pol  $\delta/\epsilon$ , RPA, PCNA, RFC, Exonuklease 1 und Endonuklease 1 (Harfe und Jinks-Robertson, 2000; Kolodner und Marsischky, 1999). Zudem ist bekannt, dass Komponenten der MMR auch mit der NER interagieren können (Hsieh, 2001; Kunkel, 1995).

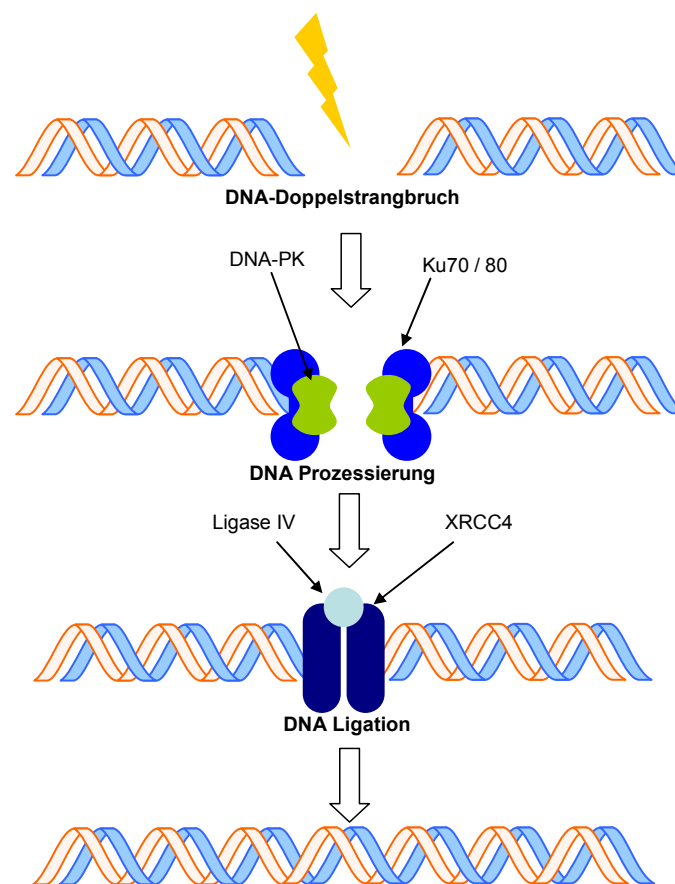
Liegt ein Defekt der MMR vor, so kann dies eine Mikrosatelliten-Instabilität zur Folge haben, die die Mutationsrate im Genom um ein Vielfaches erhöhen und daher zur Entstehung von verschiedensten Krebsarten, wie z.B. HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), beitragen kann (Jiricny, 1998).

### 3.1.4 DNA-Doppelstrangbruchreparatur: NHEJ und HR

Die DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) kann in zwei verschiedene Hauptwege unterteilt werden: Die Homologe Rekombination (HR), die auf homologievermittelten Mechanismen beruht, und die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), die keine homologen Bereiche zur Reparatur benötigt (Helleday, 2003). Die Präferenz der einzelnen Reparaturwege ist je nach Spezies unterschiedlich und wird zudem über die Phase des Zellzyklus gesteuert, in der sich die Zellen bei der Entstehung der DSB (Doppelstrangbrüche) befinden. So werden DSB in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase vor allem über die NHEJ repariert, während die Reparatur in der G<sub>2</sub>-Phase durch HR mit dem zur Verfügung stehenden homologen Schwesterchromatid erfolgen kann (Saleh-Gohari und Helleday, 2004).

Die NHEJ ist ein relativ unkomplizierter Mechanismus, bei dem die freien DNA-Enden direkt wieder miteinander verknüpft werden (siehe Abbildung 1). Dazu bindet zunächst das Heterodimer aus Ku70/Ku80 an die DNA-Enden, um diese vor Degradation zu schützen und um DNA-PKcs (*DNA-proteinkinase catalytic subunit*) zu rekrutieren. Die Proteine

bilden an der DNA der beschädigten Stelle zusammen einen Komplex. Der MRN-Komplex aus Mre11, Rad50 und Nbs1 sorgt wiederum dafür, dass die beiden DNA-Enden in räumliche Nähe gebracht sowie prozessiert werden, falls dies vor der Ligation noch erforderlich ist (nicht in der Abb. dargestellt). Auch andere Nukleasen wie z.B. Artemis können bei diesem Schritt beteiligt sein. Weitere Proteine wie der Komplex aus Ligase IV und XRCC4 sowie DNA-Polymerasen werden an die Bruchstelle rekrutiert, welche zusammen die Lücken in der DNA füllen und einzelne Abschnitte ligieren können. Da bei diesem Mechanismus Nukleotide verloren gehen oder hinzugefügt werden können, wird er als potentiell fehlerhaft betrachtet (Burma et al., 2006; Hefferin und Tomkinson, 2005).

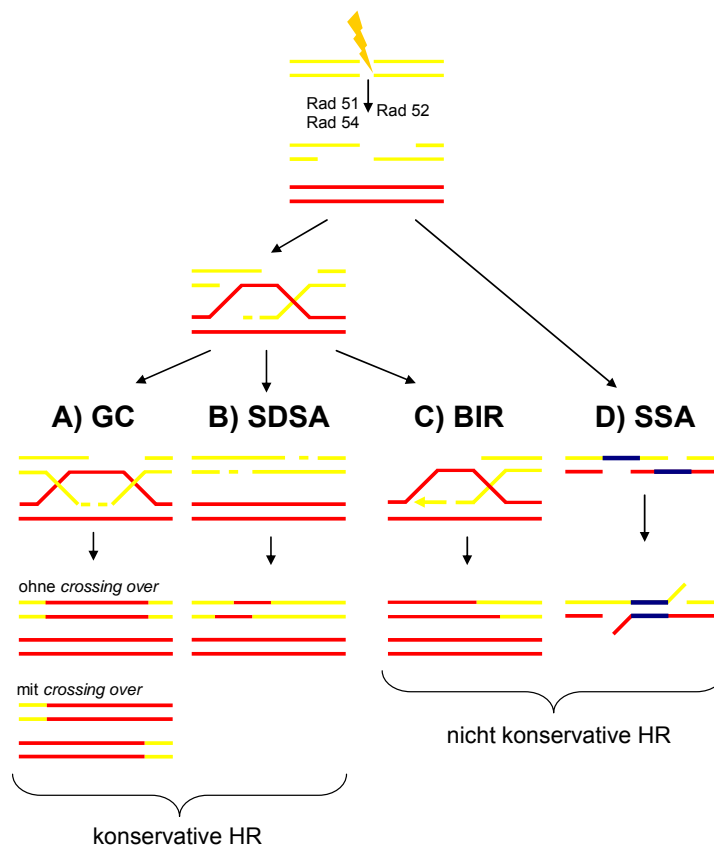


**Abbildung 1: Schema der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) freier DNA-Enden (verändert nach Hefferin und Tomkinson, 2005)**

Nach einem erfolgten DNA-DSB bindet zunächst ein Heterodimer aus Ku70/Ku80, rekrutiert DNA-PKcs (*DNA-protein kinase catalytic subunit*) und sorgt zusammen mit dem MRN-Komplex (nicht dargestellt) für eine Prozessierung der DNA-Enden, falls dies erforderlich ist. Weitere Proteine, wie die Ligase IV und XRCC4 werden an die Bruchstelle gelockt, füllen zusammen die Lücken in der DNA und ligieren die Stränge anschließend wieder miteinander.

Die HR benötigt für die Reparatur von DSB einen nicht beschädigten, homologen DNA-Strang als Vorlage. Im Allgemeinen gilt dieser Mechanismus als relativ präzise, obwohl dies nur für die beiden konservativen Wege der HR, Genkonversion (*gene conversion*: GC) und *synthesis dependent strand annealing* (SDSA), zutrifft. Bei den beiden nicht konservativen Wegen, *break induced replication* (BIR) und *single strand annealing* (SSA), können Sequenzen verloren gehen (Helleday, 2003).

Allen Wegen der HR ist gemeinsam, dass sie von einzelsträngigen DNA-Enden ausgehen, die von Rad52, Rad51 und Rad54 gebunden werden können. Diese katalysieren die Invasion des Einzelstranges in den homologen Strang (Abbildung 2). Dabei überkreuzen sich die Stränge und paaren mit der komplementären Sequenz, so dass sich sogenannte Holliday-Strukturen bilden (Helleday, 2003).



**Abbildung 2: Schema der konservativen und nicht konservativen Homologen Rekombination (HR) (verändert nach Helleday, 2003)**

Ausgehend von einzelsträngigen DNA-Enden sind die verschiedenen Wege der konservativen und nicht konservativen HR schematisch dargestellt. Bei der Genkonversion (GC: *gene conversion*) entstehen zwei Holliday-Strukturen die anschließend mit oder ohne Sequenzaustausch (*crossing over*) aufgelöst werden können. SDSA (*synthesis dependent strand annealing*) beruht auf kurzzeitiger Invasion eines einzelnen DNA-Stranges in den homologen Bereich mit anschließender DNA-Synthese. BIR (*break induced replication*) führt nach der Invasion eines Einzelstranges in die homologe Kopie zur Replikation. SSA (*single strand annealing*) beruht auf der Anlagerung zweier homologer Bereiche (in blau dargestellt) mit anschließender Prozessierung der Enden.

Bei der Genkonversion bilden sich auf diese Weise zwei Holliday-Strukturen (siehe Abbildung 2A). Die DNA-Synthese kann anschließend an dem homologen Strang fortgesetzt werden, wodurch eine der beiden Holliday-Strukturen verschoben wird. Als nächstes werden die Holliday-Strukturen über Einzelstrangbrüche aufgelöst und die Lücken im Genom werden geschlossen. Je nachdem in welcher Orientierung diese aufgelöst werden, kann dabei GC mit oder ohne *crossing over* auftreten (Pathmanathan et al., 2003; Szostak et al., 1983). Bei der SDSA wird keine zweite Holliday-Struktur ausgebildet, sondern der replizierte Strang lagert sich wieder an seinen komplementären Strang (siehe Abbildung 2B). Die Lücken, die nach der Synthese noch vorhanden sind, werden anschließend wieder aufgefüllt (Pathmanathan et al., 2003).

Die Invasion des Einzelstranges in den Homologiebereich kann aber auch zu einem alternativen Ausgang der Rekombination führen, der BIR (siehe Abbildung 2C). Dabei wechselt der eingewanderte Einzelstrang nicht wieder zurück, sondern die DNA-Synthese verläuft weiterhin am homologen Strang. Dies kann je nach Lage des homologen Bereiches zu größeren genetischen Veränderungen führen, so dass dieser Weg der nicht konservativen HR zugeordnet wird. Abbildung 2D zeigt ebenfalls einen nicht konservativen Weg der HR über SSA. Dabei lagern sich die DNA-Stränge an den homologen Bereichen aneinander und der nicht homologe Bereich wird deletiert (Pathmanathan et al., 2003; Szostak et al., 1983).

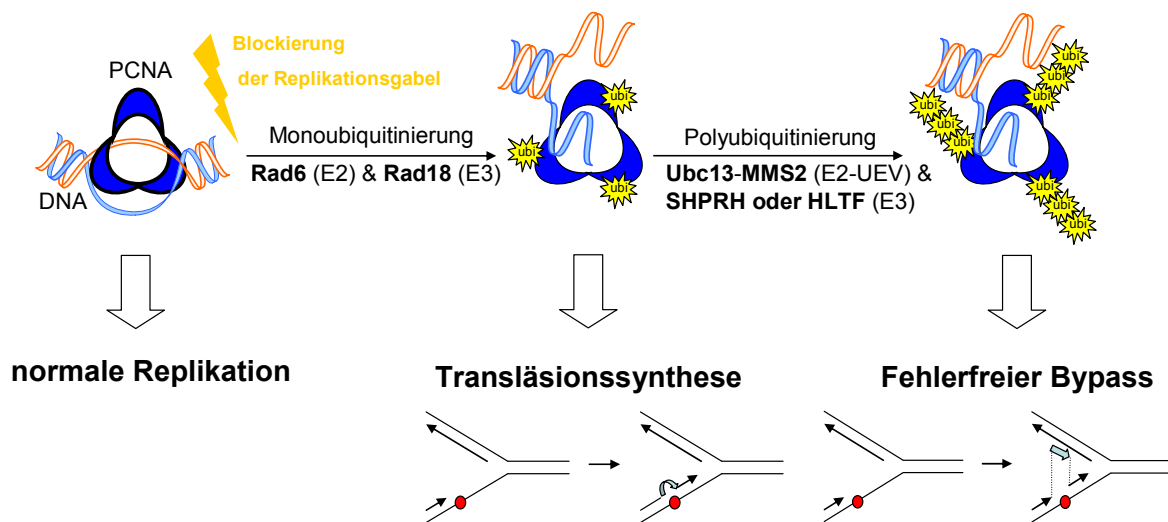
### 3.1.5 Postreplikationsreparatur

DNA-Schäden, die bis zur Replikation nicht repariert werden, können die Replikationsgabel blockieren, was möglicherweise zum Zellzyklusarrest oder zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Daher gibt es die Möglichkeit die geschädigte Stelle über Postreplikationsreparatur (PRR) zu überbrücken. Die PRR, die alternativ auch als *DNA damage tolerance mechanism* bezeichnet wird, ist im eigentlichen Sinn kein Reparaturweg, da sie den Schaden nicht beheben kann. Vielmehr hat die PRR die Funktion, den Zellen trotz Schädigung das Überleben zu ermöglichen, da sie eine Fortsetzung der Replikation trotz Blockade zulässt (Broomfield et al., 2001).

### 3.2 Der Rad6-Weg

Für die Regulation und Ausführung der PRR ist der Rad6-Weg zuständig, der v.a. in Hefen detailliert untersucht worden ist (Jentsch et al., 1987; Prakash et al., 1993). Für alle Mitglieder des Rad6-Weges konnten Homologe im Menschen identifiziert werden. Auch funktionelle Homologien zwischen den einzelnen Spezies sind vorhanden.

Es werden zwei verschiedene Pfade des Rad6-Weges unterschieden, wovon einer als eher fehlerhaft und der andere als eher fehlerfrei beschrieben wird (Lawrence, 1994; Xiao et al., 2000). Beide Pfade werden über die kovalente Modifikation von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einer Ankerplattform für Polymerasen und andere Reparaturenzyme, mit Ubiquitin am Lysin-164 (K164) aktiviert (siehe Abbildung 3). Monoubiquitinierung durch Rad6/Rad18 führt zur Transläsionssynthese (TLS), bei der fehlerhaft prozessierende Polymerasen Mutationen im Genom einführen können (Branzei et al., 2004; Zan et al., 2001; Zeng et al., 2001). Polyubiquitinierung durch Ubc13-Mms2 und Rad5 (bei Hefen) oder SHPRH bzw. HLTF in Vertebraten aktiviert hingegen einen Mechanismus, der die Läsion über meist fehlerfreie Prozesse überbrückt (Hoegel et al., 2002; Lawrence, 1994; Sood et al., 2003; Ulrich, 2005; Unk et al., 2008).



**Abbildung 3: Schema des Rad6-Weges in Vertebraten (verändert nach Hoegel et al., 2002)**

Regulation der PRR durch den Rad6-Weg. Monoubiquitinierung durch Rad6 und Rad18 führt zur Transläsionssynthese, während Polyubiquitinierung durch Ubc13-MMS2 und SHPRH bzw. HLTF einen fehlerfreien Bypass der Läsionen aktiviert.

Daneben kann das Substrat des Rad6-Weges auch durch SUMO (*small ubiquitin like modifier*) modifiziert werden. Dies erfolgt in Hefen durch Ubc9/Siz1 und rekrutiert die Helicase Srs2 an die DNA, die für einen geregelten Ablauf der HR sorgt (Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005). SUMOyliertes PCNA konnte im Gegensatz zu ubiquitiniertem



PCNA bisher weder in höheren Eukaryoten nachgewiesen noch durch DNA-Schädigung in Hefen induziert werden (Hoege et al., 2002; Stelter und Ulrich, 2003). Daher geht man bislang davon aus, dass SUMO für den alternativen Bypass von spontanen Läsionen erforderlich ist, die ohne exogene DNA-Schädigung zu einer Blockade der Replikationsgabel geführt haben (Lawrence, 1994).

### 3.2.1 Fehlerhafter Pfad des Rad6-Weges: Transläsionssynthese

Für die Überbrückung von DNA-Läsionen müssen die hoch akuraten Replikationspolymerasen, wie z.B. Pol  $\delta$ , an der blockierten Replikationsgabel durch Transläsionspolymerasen (TLS-Pols) ersetzt werden (Haracska et al., 2006; Tsui et al., 2005). Diese sind nur wenig prozessiv und besitzen eine herabgesetzte Synthesegenauigkeit, können aber durch ihr flexibles katalytisches Zentrum über die blockierende Läsion hinweg polymerisieren. Es gibt zwei Familien der Transläsionspolymerasen: die Y-Familie mit den Polymerasen  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  und Rev1 und die B-Familie mit der Polymerase  $\zeta$ . Je nach Art der DNA-Läsion werden einzelne oder mehrere TLS-Polymerasen an die DNA rekrutiert. Für alle Polymerasen der Y-Familie wurde in Eukaryoten gezeigt, dass sie durch die Monoubiquitinierung von PCNA stimuliert werden können (Bi et al., 2006; Kannouche und Lehmann, 2004; Stelter und Ulrich, 2003). Dies ist auf Ubiquitin-bindende Domänen dieser speziellen Polymerasen zurückzuführen (Bienko et al., 2005; Guo et al., 2006; Plosky et al., 2006). Die Beteiligung der TLS-Polymerasen reicht bereits dafür aus, dass Mutationen im Genom eingeführt werden (Branzei et al., 2004; Zan et al., 2001; Zeng et al., 2001).

Die Monoubiquitinierung von PCNA, die für die Aktivierung dieser Polymerasen benötigt wird, erfolgt dabei über einen Komplex bestehend aus Rad6 und Rad18. Dabei bindet Rad18 an den Einzelstrang und kann so Rad6 in räumliche Nähe zum Schaden rekrutieren, so dass diese beiden Enzyme in Kooperation Ubiquitin auf PCNA übertragen können.

### 3.2.2 Fehlerfreier Pfad des Rad6-Weges

Rad5 fungiert in Hefen als wichtigstes Bindeglied von PCNA-Mono- und Polyubiquitinierung, da es mit Rad18 interagieren kann (Hofmann und Pickart, 1999; Ulrich und Jentsch, 2000). Diese Ubiquitinligase kann ein Heterodimer aus Ubc13 und Mms2 an die DNA rekrutieren, welches am Lysin des ersten bereits an PCNA gekoppelten Ubiquitins für eine K63-gekoppelte Polyubiquitinierung sorgt. Diese ist Voraussetzung für

eine fehlerfreie Überbrückung der Läsionen, die wahrscheinlich durch homologievermittelten Wechsel zum Schwesterchromatid erfolgt (Gangavarapu, 2007). Daher muss für die fehlerfreie Reparatur eine identische, ungeschädigte Sequenz als Vorlage vorhanden sein. Der genaue Mechanismus der fehlerfreien Reparatur konnte noch nicht im Detail geklärt werden.

Erst kürzlich ist es gelungen, zwei Orthologe für Rad5 in Säugern zu identifizieren: HLTF (*Helicase Like Transcription Factor*) und SHPRH (*SNF2-H5-PHD-RING-Helicase*). Beide Proteine wurden aufgrund des vorhandenen RING-Motivs und der Helikase-Domäne als Pendant zu Rad5 eingestuft (Sood et al., 2003; Unk et al., 2008). Da sowohl SHPRH als auch HLTF mit den Komplexen aus Rad6-Rad18 und Mms2-Ubc13 interagieren und zur Polyubiquitinierung von PCNA führen können, gibt es, im Gegensatz zu Hefen, in Vertebraten zwei Ubiquitinligasen, die in den fehlerfreien Arm des Rad6-Weges eingeordnet werden können (Motegi et al., 2008; Motegi et al., 2006; Unk et al., 2008).

### 3.2.3 Ubiquitinierung und das E2-Enzym Ubc13

Die Ubiquitinierung wird als multifunktionaler Signalmechanismus angesehen, der eine Vielzahl von Prozessen regulieren kann. Es handelt sich dabei um eine post-translationale Modifikation von Proteinen durch kovalente Verknüpfung mit einem oder mehreren Ubiquitin-Proteinen. Dieser Prozess besteht aus drei Schritten: Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch ein Ubiquitinaktivierendes Enzym (E1) aktiviert. Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitinkonjugierendes Enzym (E2) übertragen, so dass jedes Ubiquitinmolekül erst im dritten Schritt, durch eine Ubiquitinligase (E3), auf das eigentliche Substrat übertragen wird. Die meisten Organismen besitzen nur ein E1-Enzym und eine limitierte Anzahl an E2-Enzymen, jedoch eine große Menge an E3-Enzymen. (Pickart und Eddins, 2004).

Ubc13 (E2) ist das Ubiquitinkonjugierende Enzym des fehlerfreien Pfades des Rad6-Weges, und ist in seiner Aminosäuresequenz und Proteinstruktur von Hefen bis hin zu höheren Eukaryoten hoch konserviert. Es ist bisher das einzig bekannte E2-Enzym, das die Verknüpfung von Ubiquitinketten über Lysin-63 induzieren kann (Eddins et al., 2006; Petroski et al., 2007). Daneben gibt es andere E2-Enzyme, die Polyubiquitinketten über das Lysin-48 verknüpfen, welche als Signal für den proteasomalen Abbau von Proteinen beschrieben worden sind (Hochstrasser, 1996; Pickart, 1997; Thrower et al., 2000).

Im Menschen konnte eine distinkte Regulation von Ubc13 über zwei UEV-Varianten (*ubiquitin E2 variants*), UEV1 und Mms2 gezeigt werden. Die Primärfunktion von Ubc13 als Komplex mit Mms2 ist die Regulation des fehlerfreien Arms der PRR. Daneben kann Ubc13 zusammen mit UEV1 den NFκB-Signalweg von Zellen aktivieren. Damit steuert Ubc13 zwei sehr unterschiedliche Prozesse, die einmal die Replikation stoppen, um vorhandene Läsionen über PRR zu überbrücken und das andere Mal als Überlebenssignal fungieren. (Andersen et al., 2005; McKenna et al., 2003; Moraes et al., 2001; Pastushok et al., 2005; VanDemark et al., 2001; Xiao et al., 1998).

Ein vollständiger *knockout* von Ubc13 konnte bisher in Vertebraten nicht auf direktem Weg erreicht werden. Ubc13<sup>-/-</sup>-Mäuse sterben wahrscheinlich durch Probleme in der Neuronentwicklung sehr früh. Daher gibt es zur Untersuchung der Funktion konditionale Maussysteme (Fukushima et al., 2007).

### 3.3 Das Immunsystem von Vertebraten

---

Da die meisten genetischen Veränderungen für Organismen schädlich sind, betreibt die Zelle einen hohen Aufwand um geschädigte DNA zu reparieren. Doch gibt es Stellen im Genom, in denen eine hohe Mutationsrate für die Zellen von Nutzen ist. Dies ist z.B. bei den Immunglobulinen der Fall, die für Antikörper (Ak) kodieren und konstant diversifiziert werden müssen (Ig-Diversifizierung), um eine Abwehr von möglichst vielen, sich ständig verändernden Pathogenen zu gewährleisten (Janeway, 2008). Bei einigen B-Zell-Lymphomen, wie z.B. den Hodgkin- und Burkitt-Lymphomen, konnte aber schon nachgewiesen werden, dass diese auf fehlerhafte Prozesse zur Ig-Diversifizierung zurückzuführen sind (Cario et al., 2000; Kuppers et al., 1994; Tamaru et al., 1995).

Dies verdeutlicht das Risiko der Krebsentstehung durch Mutationen und vor allem Brüche, die während der Reifung von B-Zellen induziert werden (Re et al., 2005). Die Zelle hat aber die Möglichkeit, diese Brüche über die beiden Hauptwege der DSBR zu reparieren (siehe 3.1.4). Damit sind nicht die Doppelstrangbrüche an sich, sondern erst die fehlgeleiteten Reparaturwege für die Tumorentstehung verantwortlich (Kanaar et al., 1998)

#### 3.3.1 Kurze Einführung in das Immunsystem

Das Immunsystem von Vertebraten beruht auf der Erkennung von Selbst und Fremd und lässt sich in zwei große Bereiche einteilen (Wiens et al., 2007). Das angeborene

Immunsystem reagiert relativ unspezifisch, indem es gängige Muster auf der Oberfläche von Pathogenen erkennt und diese schnell eliminieren kann. Das adaptive Immunsystem hingegen benötigt mehr Zeit bis es die Erreger spezifisch bekämpfen kann. Nach einer ersten Antigen-unabhängigen Umlagerung der VDJ-Gene von T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen), passen sich B-Zellen durch somatische Veränderung der Gene, die für Rezeptoren auf der Oberfläche kodieren, dem Erreger an. Diese speziellen Blutzellen können daher eine viel größere Anzahl an verschiedenen Pathogenen erkennen und gewährleisten außerdem in Form von Gedächtniszellen eine schnellere Bekämpfung bei einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen.

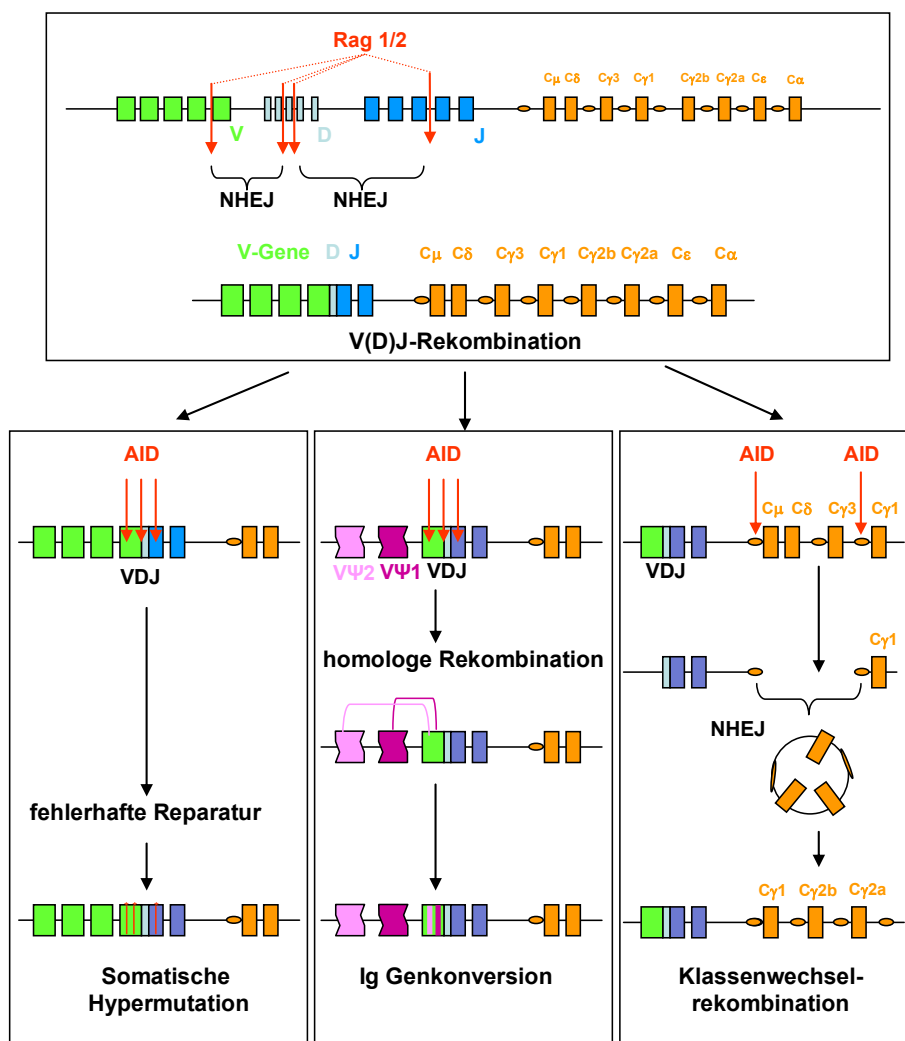
T-Zellen besitzen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (*T-cell receptor: TCR*) und sind für die zelluläre Immunantwort zuständig. B-Zellen können durch membrangebundene Immunglobuline (*B-cell receptor: BCR*) an Antigene (Ag) binden und nach der Ausdifferenzierung zu Plasmazellen Antikörper derselben Spezifität sezernieren. Diese Ak sind gegen Erreger in den Körperflüssigkeiten gerichtet und damit Teil der humoralen Immunantwort. Jeder Lymphozyt besitzt Rezeptoren, die jeweils nur ein spezifisches Ag erkennen können. Da die Abwehr von möglichst vielen Erregern gewährleistet werden soll, gibt es im Körper ein großes Repertoire an verschiedenen Lymphozyten, die bei einer Infektion aktiviert werden können (Janeway et al, 2001).

### 3.3.2 Genetische Vielfalt des Immunsystems

Die Vielfalt des Immunsystems entsteht durch die Modifikation einer begrenzten Anzahl an Gensegmenten über vier verschiedene Mechanismen (Tonegawa, 1983): V(D)J-Rekombination, Ig-Genkonversion, Klassenwechselrekombination und Somatische Hypermutation. Dabei werden DNA-Schäden und auch DNA-Brüche induziert, deren Reparatur letztendlich zu einem großen Repertoire an Rezeptoren führt (siehe Abbildung 4).

Die V(D)J-Rekombination findet während der frühen Lymphozytenreifung im Knochenmark (BCR) bzw. Thymus (TCR) statt. Dabei werden die verschiedenen V-Segmente (*variable segments*) mit D-Segmenten (*diversity segments*) und J-Segmenten (*joining segments*) kombiniert (Bassing et al., 2002; Tonegawa, 1983). Der Rekombinase-Komplex aus RAG1/RAG2 (*RAG: recombination activating gene*) setzt dazu gezielt Brüche in bestimmte Rekombinationssignalsequenzen, die die einzelnen V-, D- und J-Segmente flankieren (Schatz et al., 1989). Diese Brüche werden anschließend über NHEJ

neu verbunden (Kirchgessner et al., 1995). Für die Diversität von T-Lymphozyten ist dieser Mechanismus ausreichend.



**Abbildung 4: Mechanismen zur Generierung der Lymphozyten-Ag Rezeptoren (verändert nach Jungnickel, 2006)**

Vier Mechanismen zur Ag-Rezeptor-Diversifikation sind schematisch dargestellt: V(D)J-Rekombination, SHM, Ig-Genkonversion und die Klassenwechselrekombination. Siehe Text für Details.

Rag1/2: *recombination activating gene*; V-Gene: *variable segments*; D-Gene: *diversity segments*; J-Gene: *joining segments*; AID: Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase; NHEJ: *non homologous end joining*; rote Pfeile: AID-induzierte DNA-Läsionen; rote Striche: Mutationen, die während der SHM eingeführt wurden.

In B-Zellen einiger Spezies, wie z.B. den Farmtieren Huhn, Hase, Kuh, Schwein und Pferd, dient die V(D)J-Rekombination nur der allelischen Exklusion. Dabei handelt es sich um einen genetischen Mechanismus, der garantiert, dass jeder Ak trotz zweier vorhandener Allele für die leichte und schwere Kette nur eine Spezifität besitzt, da jeweils ein Allel nicht exprimiert wird (Janeway et al., 2007). Da diese Tiere nur ein einziges V- und J-Gensegment besitzen, verfügen sie über einen alternativen Mechanismus um ein vielfältiges Repertoire an Primärantikörpern zu erzeugen, die Ig-Genkonversion. Diese findet in Hühnerzellen in der *bursa of fabricius* statt und führt über Rekombinationsmechanismen

zum genetischen Transfer homologer Pseudogenesequenzen ( $\Psi$ V-Gene) aus stromaufwärts liegenden Bereichen im Ig-Locus (Reynaud et al., 1987). Der Locus der leichten Kette von Hühnern verfügt über 25 verschiedene  $\Psi$ V-Gene, während die schwere Kette 80 verschiedene  $\Psi$ V-Gene enthält (McCormack und Thompson, 1990; Reynaud et al., 1987). Diese Pseudogene besitzen keine Promotoren, keine Leit-Exons oder V(D)JRekombinations-Signal-Sequenzen (Kim et al., 1990; Reynaud et al., 1987). Dabei werden nur Pseudogene von demselben Chromosom als Donor verwendet, von denen 8 - 200 bp Fragmente im variablen Bereich nachgewiesen werden können (McCormack et al., 1990; Carlson et al. 1990).

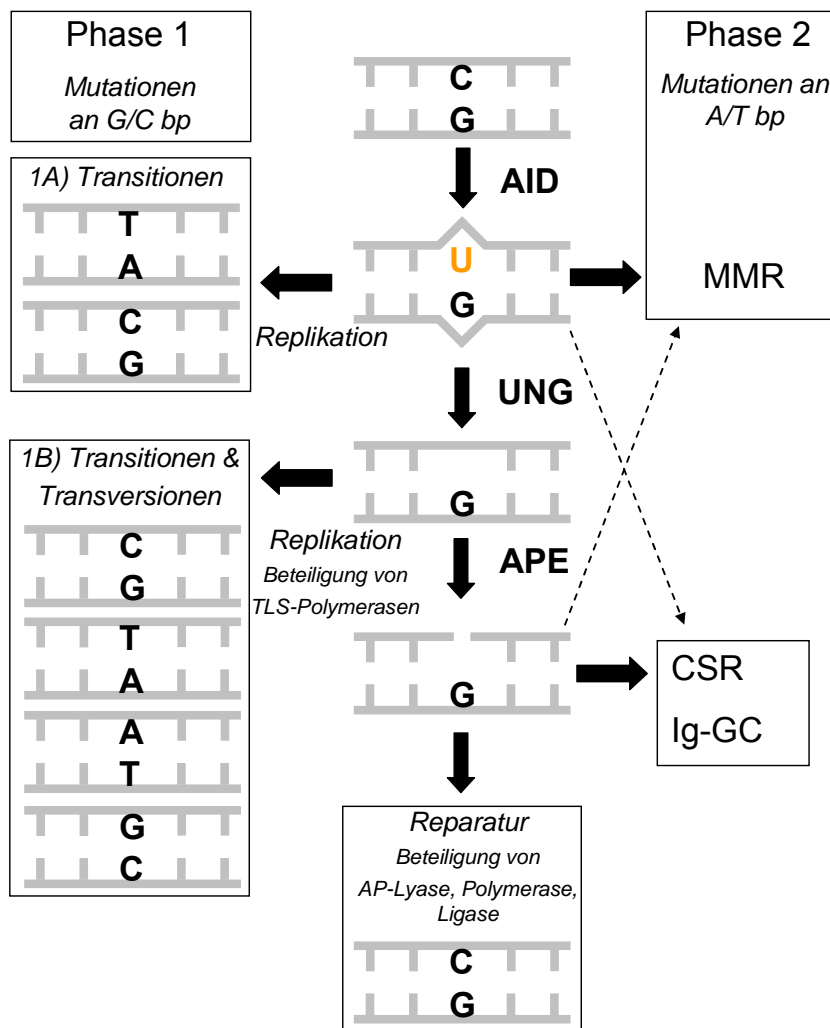
### 3.3.3 Antigen-abhängige Diversifikation des Antikörper-Repertoires von Mensch und Maus

Die Somatische Hypermutation (SHM) dient der Affinitätsreifung von B-Zellen und findet ausschließlich im Keimzentrum statt, dem Ort der Sekundärreifung für Zellen der spezifischen Abwehr (Janeway et al., 2001). Meist werden dabei zusätzliche Punktmutationen in Form von Transitionen und Transversionen in die V-Gene eingeführt (Golding et al., 1987). Seltener kann dieser Prozess aber auch zu Deletionen und Duplikationen führen (Goossens et al., 1998). Durch SHM und eine sich anschließende Selektion können hoch affine Ak entstehen, die besser an den Erreger binden und ihn damit effizienter bekämpfen können (Rajewsky, 1996).

Dabei spielt das Enzym Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase (AID) eine entscheidende Rolle (Honjo et al., 2004; Muramatsu et al., 2000). Das gängige Modell geht von einer DNA-Deaminierung durch AID aus, so dass aus Cytosin die Base Uracil entsteht, welche normalerweise nicht als Baustein der DNA vorkommt (Di Noia und Neuberger, 2007). Ausgehend davon können verschiedene, voneinander unabhängige und parallel agierende Wege eingeschlagen werden, die durch fehlerfreie bzw. fehleranfällige Mechanismen zu unterschiedlichen Endprodukten führen können (siehe Abbildung 5).

Es werden dabei zwei Phasen unterschieden, die sich durch die Einführung von Mutationen an dC:dG- bzw. an dA:dT Basenpaaren (bp) unterscheiden. Wird über das initiale, durch AID entstandene Uracil hinweg repliziert, kommt es zu Transitionen an dG:dC bp (Abbildung 5, Phase 1A). Da Uracil aber durch die Uracil-N-Glykosylase (UNG) erkannt und entfernt werden kann, können auch abasische Stellen entstehen, die durch TLS-

Polymerasen wieder aufgefüllt werden, so dass Transitionen und Transversionen an dG:dC bp entstehen können (Abbildung 5, Phase 1B).



**Abbildung 5: Modell zur Reparatur AID-induzierter Läsionen (nach Rada et al., 2004)**

Ausgehend von der initialen Läsion durch AID, das Cytosin zu Uracil deaminieren kann, sind die verschiedenen Wege und Phasen der SHM dargestellt. Für Details siehe Text.

Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase: AID; Uracil-N-Glykosylase: UNG; *apyrimidinic endonuclease*: APE; *mismatch*-Reparatur: MMR; *class switch recombination*: CSR; *Immunglobulin gene conversion*: Ig-GC

Die abasische Stelle kann aber auch als Substrat für ein weiteres Enzym, *apyrimidinic endonuclease* (APE), dienen, welches Einzelstrangbrüche in die DNA einführen kann. Prinzipiell können diese auch über die konventionelle BER in einem fehlerfreien Modus repariert werden, doch führt dies zu keiner verbesserten Affinität der Ak.

Der Mechanismus, der zu Mutationen an A:T Basenpaaren führt, konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Man geht aber davon aus, dass dabei die beiden initialen Proteine der MMR (MSH2/MSH6) die U:G-Fehlpaarungen erkennen und unter Beteiligung von Exonuklease I die fehlerhaften sowie auch angrenzenden Basen entfernen können

(Abbildung 5, Phase 2). Bei der Resynthese dieses längeren Stückes werden fehlerhaft prozessierende Polymerasen wie z.B. Pol  $\eta$  rekrutiert, was häufig zu Mutationen führen kann. (Delbos et al., 2007; Di Noia und Neuberger, 2007; Wilson et al., 1998).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch das Fehlen von UNG die CSR substantiell beeinträchtigt sowie das Hypermutationsmuster verändert wird (Di Noia und Neuberger, 2002; Imai et al., 2003; Rada et al., 2002). Bei einer vollständigen Deaktivierung von UNG in Hühner-B-Zellen wurde zudem die Ig-Diversifizierung über Ig-GC vollständig blockiert (Di Noia und Neuberger, 2004; Saribasak et al., 2006).

Neben den bereits erwähnten Reparaturwegen konnte jüngst eine Beteiligung des Rad6-Weges bei der SHM gezeigt werden. Dieser steuert durch die Ubiquitinierung von PCNA die Rekrutierung verschiedener TLS-Polymerasen, die für die fehlerhafte Reparatur im Ig-Lokus und damit auch für die hohe Mutationsrate von B-Zellen erforderlich ist, die erst eine gute Immunabwehr ermöglicht (Arakawa, 2006; Bachl et al., 2006; Langerak et al., 2007).

Naive B-Zellen, die vorher noch keinen Kontakt zum Ag hatten, produzieren Ak der Klasse IgM oder IgD, welche nur eine geringe Affinität zum Pathogen besitzen. Um andere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren zu können, wird nach Ag-Kontakt durch die Klassenwechselrekombination (*class switch recombination: CSR*) der konstante Teil und damit die Hauptklasse der Ak verändert (Manis et al., 2002). Auch bei diesem Prozess ist AID beteiligt, das an den Schalterregionen (*switch-regions*) zwischen den für verschiedene Ak-Isotypen kodierenden Gensegmenten Schäden einführt. Diese bewirken im weiteren Verlauf DSB, welche über NHEJ wieder miteinander verknüpft werden, wodurch Ak der Klasse IgG, IgA oder IgE entstehen (Casellas et al., 1998; Muramatsu et al., 2000).

### 3.3.4 Besonderheiten der Antigen-abhängigen Diversifikation im Huhn

In Hühnern erfolgt die Ig-Diversifizierung der Ak in erster Linie in der *bursa of fabricius* und durch die Ig-Genkonversion. Im Keimzentrum können die Ig-Gene auch durch den Mechanismus der SHM zusätzlich diversifiziert werden (Arakawa et al., 2006; Arakawa et al., 1998; Arakawa und Buerstedde, 2004). SHM und Ig-GC sind zwei verwandte Prozesse, die sich von denselben AID-induzierten Läsionen ableiten lassen (Diaz und Flajnik, 1998; Muramatsu et al., 2000). Auch der Klassenwechsel findet bei Hühnern im Keimzentrum statt und sorgt für eine bessere Effektorfunktion der generierten Ak (Yasuda et al., 2003).



Die Mechanismen zur Ig-Diversifizierung lassen sich am Besten in primären B-Zellen analysieren. Doch sind diese in der Zellkultur nicht stabil, so dass für die genaue Untersuchung meist Lymphomzelllinien verwendet werden. Aus der *bursa of fabricius* von Hühnern wurde dazu durch Infektion mit dem *avian leukosis virus* (ALV) eine Hühner-B-Lymphomzelllinie (DT40-Zellen) hergestellt, die sich im Gegensatz zu humanen Lymphomzelllinien durch eine hohe Rate an Ig-Genkonversion auszeichnet (Buerstedde et al., 1990). DT40-Zellen befinden sich in einem physiologischen Zustand, welcher sich der bursalen Entwicklungsphase von Hühner-B-Zellen ähnelt. Daher ist der Prozess der Ig-GC während der *in vitro* Zellkultur kontinuierlich aktiv und kann somit leicht analysiert werden (Kim et al. 1990; Buerstedde et al. 1990). Ein weiterer Vorteil dieser Zelllinie ist die hohe Frequenz, mit der DT40-Zellen transfizierte Genkonstrukte homolog integrieren. Dies ist wahrscheinlich ein Nebeneffekt der hohen Rate an Ig-GC (Buerstedde, Takeda 1991).

Eine komplette Blockierung der Ig-GC, die gleichzeitig zu einer Erhöhung der SHM in DT40-Zellen führt, konnte in DT40 durch die Deletion aller Pseudogensequenzen erreicht werden (Arakawa et al., 2004). Weitere Untersuchungen mit DT40-Mutanten haben gezeigt, dass es eines Wechselspiels verschiedener Reparaturwege und Faktoren für die Regulation von SHM und Ig-GC bedarf, das es noch weiter aufzuklären gilt (Bezzubova et al., 1997; Hatanaka et al., 2005; Sale et al., 2001).

### 3.4 Zielsetzung

---

Die Reparatur von DNA-Läsionen während der DNA-Replikation wird in Eukaryoten von den Genen des Rad6-Weges geregelt und kann über einen fehlerfreien oder potentiell fehlerhaften Weg erfolgen. Der Reparaturprozess wird dabei über die Mono-, bzw. Polyubiquitinierung von PCNA gesteuert.

Die Enzyme des Rad6-Weges sind auch in Vertebraten evolutionär erhalten, allerdings haben sich die meisten Studien vor allem mit der Aufklärung der Regulation und Bedeutung der Monoubiquitinierung von PCNA beschäftigt. Über die Polyubiquitinierung war zu Beginn dieser Doktorarbeit lediglich bekannt, dass diese in Hefen durch die Interaktion von Rad5 mit dem Komplex Ubc13/Mms2 nach Schädigung induziert werden kann und dazu führt, dass der Bypass über einen wahrscheinlich homologieabhängigen, fehlerfreien Mechanismus stattfindet.

Rekombination und gerichtete Mutagenese sind für die Vielfalt der Antikörper in Vertebraten verantwortlich. Für den Prozess der Somatischen Hypermutation (SHM), der zur gerichteten Mutagenese in den Ig-Genen führt, konnte auch in unserer Gruppe bereits eine Regulation über den Rad6-Weg bzw. den Ubiquitinierungsstatus von PCNA gezeigt werden. Die Ig-Genkonversion (Rekombination) scheint jedoch weitgehend unabhängig vom Rad6-Weg zu verlaufen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte bestimmt werden, inwieweit die Funktionen einzelner Mitglieder des Rad6-Weges, und insbesondere Ubc13, in Vertebraten konserviert sind. Dazu sollten Studien zur PCNA-Ubiquitinierung in verschiedenen Vertebratenzelllinien und nach Behandlung mit unterschiedlichen DNA-schädigenden Agenzien durchgeführt werden. Zudem sollte untersucht werden, ob Vertebraten den Ubiquitinierungsstatus und den Ubc13-Anteil je nach Situation anpassen bzw. durch andere Faktoren regulieren können. Von besonderem Interesse für uns war aber, ob Ubc13 im Verlauf der Evolution bei Vertebraten zusätzliche Funktionen bei der Ig-Diversifizierung übernommen hat, für die es in Hefen kein Äquivalent gibt. Dazu wurden mit Ubc13<sup>+/-</sup> DT40-Zellen Ig-Genkonversionsassays sowie SHM-Assays durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aktivität der PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten

---

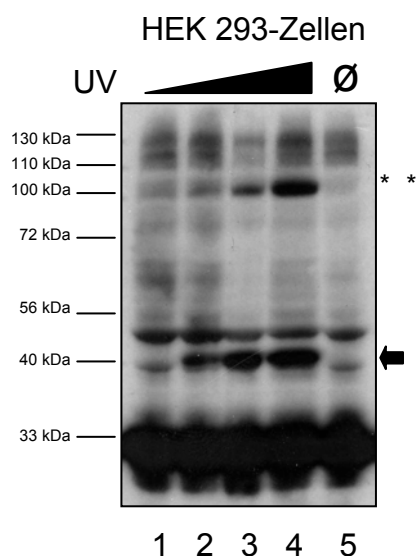
Um die Rolle der Monoubiquitinierung bzw. Polyubiquitinierung von PCNA bei der Reparatur von DNA-Schäden in verschiedenen Vertebratenzellen zu untersuchen, sollten PCNA-Ubiquitinierungsassays etabliert werden. Dazu wurden, durch die Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien bzw. UV, in den Zellen DNA-Läsionen und Brüche eingeführt und diese im nächsten Schritt durch Western Blot Analyse auf die Induktion von PCNA-Modifikationen hin analysiert. Da durch jedes konjugierte Ubiquitin-Molekül das Molekulargewicht von PCNA um ca. 7 kDa erhöht wird, sollte ubiquitiniertes PCNA durch den Einsatz dieser Auftrennungsmethode deutlich von nicht modifiziertem PCNA zu unterscheiden sein.

#### 4.1.1 Etablierung von PCNA-Ubiquitinierungsassays

PCNA-Ubiquitinierungsassays waren bereits vor Beginn dieser Doktorarbeit in anderen Arbeitsgruppen mit adhären, humanen Zelllinien durchgeführt worden (Hoege et al., 2002; Ogi et al., 2005), so dass zur Etablierung in unserem Labor die adhärente Zelllinie HEK 293 (humane, embryonale Nierenzellen) verwendet wurde. Dazu wurden die Zellen für einige Sekunden mit unterschiedlichen UV-Dosen bestrahlt. Hierbei dienten die bestehenden Publikationen mit humanen Zelllinien als Orientierung, in denen meist eine UV-Dosis von 0-30 J/m<sup>2</sup> eingesetzt worden ist, so dass wir diese Dosis in all unseren Experimenten als Vergleichswert mitgeführt haben (Okada et al., 2002; Yamashita et al., 2002). Zusätzlich zu der in Hefeexperimenten verwendeten UV-Maximaldosis von 200 J/m<sup>2</sup> (Stelter und Ulrich, 2003), wurden höhere UV-Dosen von 500 und 1000 J/m<sup>2</sup> sowie unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

In Abbildung 6 sind neben dem starken Signal für unmodifiziertes PCNA bei ca. 33 kDa weitere PCNA-Banden höheren Molekulargewichtes zu erkennen. Diese Banden sind bei der niedrigsten UV-Dosis von 20 J/m<sup>2</sup> relativ schwach, werden aber ab einer UV-Dosis von 200 J/m<sup>2</sup> sehr deutlich induziert. Die durch höhere UV-Dosen verstärkte Bande auf Höhe von 40 kDa wurde aufgrund des Molekulargewichtes und der Beschreibung in der Literatur monoubiquitiniertem PCNA zugeordnet (Abbildung 6, Bahn 2-4, durch Pfeil markiert). Die Bande knapp oberhalb von 40 kDa blieb für alle UV-Stufen konstant und war auch bei unbehandelten Zellen deutlich zu erkennen, so dass es sich dabei um eine unspezifische Hintergrundbande handeln könnte. Auch könnte es sich hierbei um eine andere

Modifikation von PCNA wie z.B. SUMOylierung handeln, die nicht durch DNA-Schäden induziert wird (Arakawa et al., 2006). Zudem ist eine höhermolekulare Bande bei 100 kDa zu sehen, die durch stärkere UV-Dosen deutlich zunimmt (Abbildung 6, durch zwei Sterne markiert). Diese Bande war zuvor in keiner anderen Vertebratenzelllinie detektiert worden, so dass eine klare Zuordnung ohne weitere Untersuchungen nicht möglich war. Es könnte sich dabei um PCNA-Moleküle handeln, die mit einem größeren oder mehreren mittelgroßen bis kleineren Proteinen, wie z.B. Ubiquitinketten, assoziiert sind.



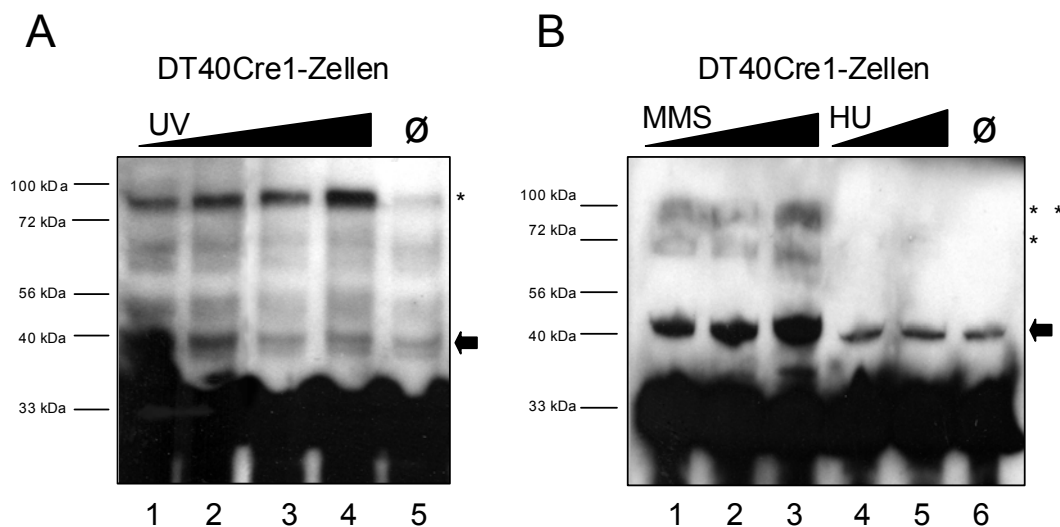
**Abbildung 6: Etablierung von PCNA-Ubiquitinierungsassays in HEK 293-Zellen**

Proteinextrakte von HEK 293-Zellen wurden nach verschieden starker UV-Behandlung mittels Western Blot mit Hilfe eines anti-PCNA Ak analysiert: 1) 20 J/m<sup>2</sup>; 2) 200 J/m<sup>2</sup>; 3) 500 J/m<sup>2</sup>; 4) 1000 J/m<sup>2</sup>; 5) MOCK

◄: monoubiquitiniertes PCNA; \* \*: höhermolekulare PCNA-Bande

Als nächstes sollte dieser Assay in der Hühner-B-Zelllinie DT40 etabliert werden, die in unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung des Rad6-Weges verwendet wird. DT40-Zellen wurden mit den gleichen UV-Dosen bestrahlt, wie zuvor für HEK 293-Zellen beschrieben. Die Western Blot Analyse mit einem anti-PCNA Ak ergab auch hier eine starke Bande für unmodifiziertes PCNA, sowie mehrere Banden höheren Molekulargewichtes (siehe Abbildung 7A). Doch wird im Gegensatz zur humanen Zelllinie bei DT40-Zellen monoubiquitiniertes PCNA durch UV-Bestrahlung kaum induziert. (Abbildung 7A, durch Pfeil markiert). Eine distinkte höhermolekulare Bande wird in DT40-Zellen bei ca. 72 kDa induziert, die durch eine stärkere Bestrahlung zunimmt. Jedoch ließ sich diese Bande ohne weitere Untersuchungen noch nicht genau zuordnen (Abbildung 7A, Bahn 1-4, durch Stern markiert).

Da wir die Monoubiquitinierung in B-Zellen genauer untersuchen wollten, wurde mit anderen Methoden wie z.B. dem DNA-alkylierenden Agens MMS (Methyl-Methansulfonat) und dem DNA-Synthese Hemmer HU (Hydroxyurea) versucht, eine Monoubiquitinierung in DT40-Zellen zu erreichen. Diese beiden Agenzien sind aus der Literatur als DNA-schädigende Drogen bekannt, die zu einer Blockade der Replikationsgabel führen und damit den Rad6-Weg aktivieren können (Belgi und Friedmann, 2002; Wyatt und Pittman, 2006). Die Western Blot Analyse zeigt nach MMS-Behandlung eine deutliche Zunahme der monoubiquitinierten Form von PCNA bei ca. 40 kDa als auch der höhermolekularen Banden bei 72 bzw. 100 kDa (Abbildung 7B, Bahn 1-3, durch Pfeil und Sterne markiert). Im Gegensatz dazu wird durch die Behandlung mit HU keine PCNA-Ubiquitinierung induziert die über dem Level unbehandelter Zellen liegt (Abbildung 7B, siehe Bahn 4/5/6). Dies könnte daran liegen, dass die Zellen insgesamt schon relativ stark vorinduziert waren. Diese Vorinduktion wurde in mehreren Experimenten in unterschiedlicher Stärke beobachtet und ist wahrscheinlich auf eine Stressreaktion der Zellen wie z.B. auf Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen (Stadtman, 1992).



**Abbildung 7: Etablierung von PCNA-Ubiquitinierungsassays in DT40-Zellen**

Proteinextrakte von DT40-Zellen wurden nach verschieden starker UV, MMS und HU-Behandlung mittels Western Blot mit Hilfe eines anti-PCNA Ak analysiert.

A) DT40Cre1-Zellen die unterschiedlich stark bestrahlt wurden: 1) 20 J/m<sup>2</sup>; 2) 200 J/m<sup>2</sup>; 3) 500 J/m<sup>2</sup>; 4) 1000 J/m<sup>2</sup>; 5) MOCK; B) DT40Cre1-Zellen nach Behandlung mit MMS und HU: 1) 0,02 % MMS; 2) 0,1 % MMS; 3) 0,5 % MMS; 4) 1 mM HU; 5) 20 mM HU; 6) MOCK

◀: monoubiquitiniertes PCNA; \*, \* \*: höhermolekulare PCNA-Banden

Die Etablierung von Ubiquitinierungsassays mit verschiedenen Vertebratenzelllinien ermöglichte es in der Zelllinie HEK 293 eine Monoubiquitinierung von PCNA nach UV-Behandlung nachzuweisen. In der B-Zelllinie DT40 ließ sich hingegen weder durch

Behandlung mit UV-Strahlung noch durch HU eine Monoubiquitinierung von PCNA induzieren, allerdings konnte dies durch eine Behandlung mit MMS erreicht werden. Zusätzlich zu der Monoubiquitinierungsbande konnten in beiden Zelltypen auch höhermolekulare Banden detektiert werden, zu deren genauen Identifizierung allerdings noch weitere Experimente nötig waren.

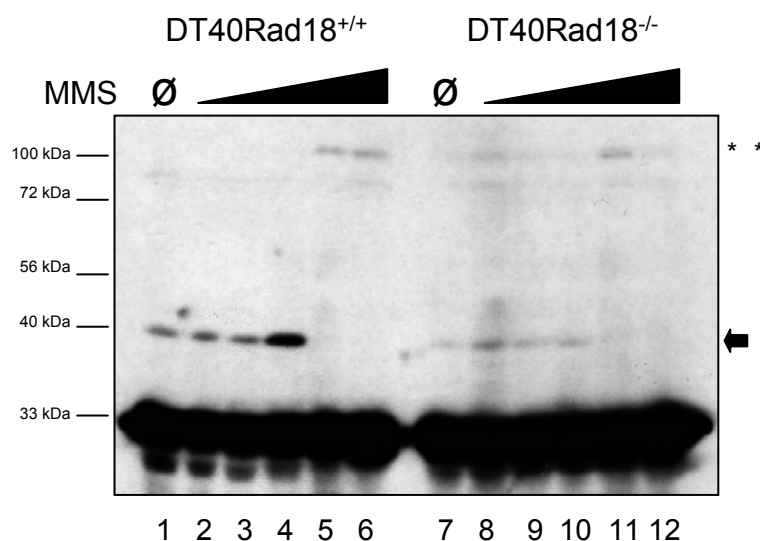
#### 4.1.2 Rolle von Rad18 bei der Ubiquitinierung von PCNA

In unserer Arbeitsgruppe war im Vorfeld die Ubiquitinligase Rad18 in DT40-Zellen ausgeschaltet worden, um die potentielle Rolle des Rad6-Weges bei der SHM zu testen. Da sich in diesen Zellen tatsächlich eine Verringerung der SHM-Rate nachweisen ließ, war es im Rahmen dieser Studie wichtig zu untersuchen, ob eine Rad18-Defizienz die PCNA-Ubiquitinierung beeinflussen kann. Damit ließe sich erstmals eine direkte Regulation der SHM durch den Rad6-Weg aufzeigen.

Da sich die Induktion der Monoubiquitinierung durch MMS im Vorfeld als die beste Methode im DT40-System erwies, wurden PCNA-Ubiquitinierungsassays in Rad18-defizienten DT40-Zellen (Rad18<sup>-/-</sup>) und Rad18-profizienten DT40-Zellen (Rad18<sup>+/+</sup>) mit verschiedenen MMS-Konzentrationen durchgeführt. Neben einer geringen Vorinduktion der Monoubiquitinierung bei unbehandelten Zellen beider Zelltypen ist bei Behandlung von Rad18<sup>+/+</sup>-Zellen eine deutliche Bande für monoubiquitiniertes PCNA zu erkennen, die durch Erhöhung der MMS-Dosis zunächst verstärkt wird (Abbildung 8, Bahn 2-4, durch Pfeil markiert). Doch ab einer gewissen Konzentration dieser Droge verschwindet die Bande für PCNA-Monoubiquitinierung vollständig und eine höhermolekulare Bande wird sichtbar (Abbildung 8, Bahn 5/6, durch zwei Sterne markiert). Im Gegensatz dazu ist bei Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen die Induktion der Monoubiquitinierung deutlich schwächer, die Induktion der höhermolekularen Bande bei knapp 100 kDa ist hingegen nur etwas geringer (Abbildung 8, Bahn 8-12).

Dies zeigt zum einen, dass die Rolle von Rad18 als Ubiquitinligase des Rad6-Weges auch in Vertebraten konserviert ist. Außerdem verdeutlicht dieses Experiment überraschenderweise, dass eine von Rad18 unabhängige Form der Ubiquitinierung von PCNA in DT40-Zellen existiert, die so in Hefen ohne Rad18 nicht möglich ist (Bienko et al., 2005; Hoege et al., 2002). Dies ist wahrscheinlich auf weitere E3-Ligasen in Vertebraten-Zelllinien zurückzuführen, die zusätzlich PCNA ubiquitinieren können wenn die Hauptubiquitinligase des Rad6-Weges, Rad18, nicht verfügbar ist. So konnte jüngst

eine weitere E3-Ligase, RNF8, als verantwortliche E3-Ligase für PCNA-Monoubiquitinierung identifiziert werden (Huang et al., 2009; Zhang et al., 2008b).



**Abbildung 8: Ubiquitinierungsassays in DT40Rad18<sup>+/+</sup> und DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen**

DT40Rad18<sup>+/+</sup> und DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an MMS behandelt und anschließend per Western Blot mit Hilfe eines anti-PCNA Ak analysiert: Spalte 1 und 7) MOCK; 2 und 8) 0,0002 % MMS; 3 und 9) 0,001 % MMS; 4 und 10) 0,004 % MMS; 5 und 11) 0,02 % MMS; 6 und 12) 0,1 % MMS

◄: monoubiquitiniertes PCNA; \* \* : höhermolekulare PCNA-Bande

### 4.1.3 Weitere Untersuchungen zur PCNA-Modifikation

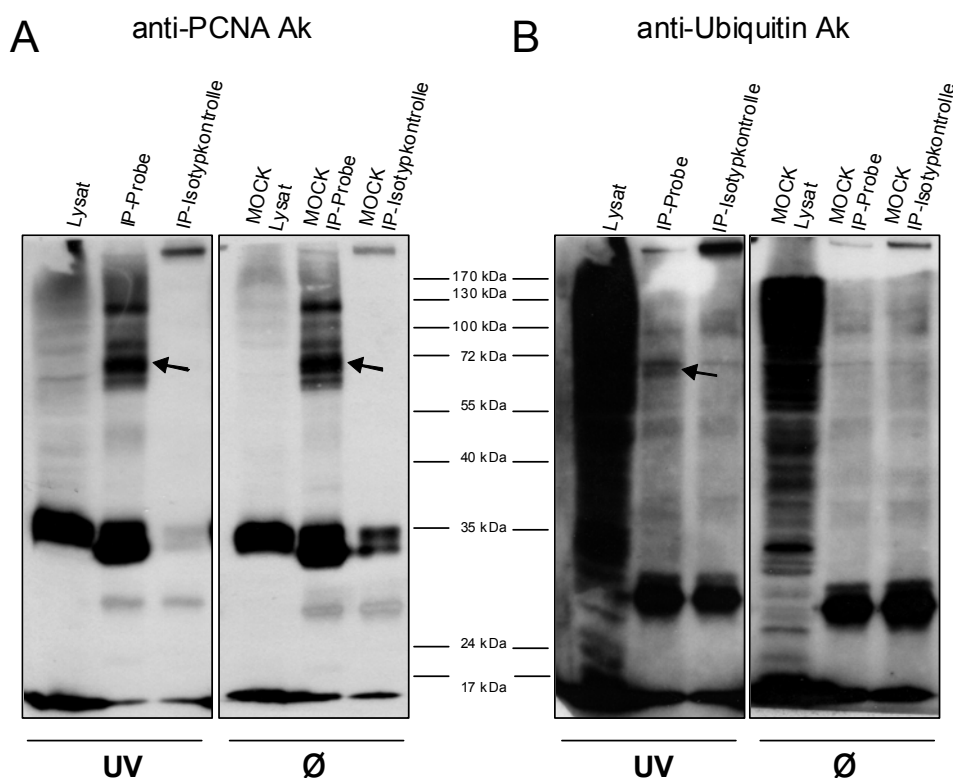
#### 4.1.3.1 Ko-Immunopräzipitation in DT40-Zellen

Um die Identität der höhermolekularen Bande zu bestimmen, die bei der Durchführung unserer Ubiquitinierungsassays durch Inkubation mit dem PCNA-Ak detektiert werden konnte, sollte die Verknüpfung von Ubiquitin an PCNA mit einer weiteren biochemischen Methode geprüft werden. Dazu wurde eine Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) mit dem anti-PCNA Ak im DT40-System etabliert. Als Kontrollen wurden während der gesamten Prozedur der Ko-IP unbehandelte Zellen (MOCK), sowie eine Kontrolle für den verwendeten Ak mitgeführt (Isotyp-Kontrolle). Außerdem wurde der Gesamtzellextrakt vor Immunopräzipitation der PCNA-Komplexe analysiert (Lysat).

Da im Vorfeld die beste Induktion der höhermolekularen PCNA-Bande im DT40-System durch UV erreicht worden ist, wurde eine PCNA-Ko-IP nach UV-Bestrahlung durchgeführt, die in Abbildung 9 dargestellt ist. Bei Detektion durch einen anti-PCNA Ak ist im Lysat der UV-behandelten Probe eine Bande bei ca. 72 kDa nachweisbar, die in der

unbestrahlten Probe nur sehr schwach zu erkennen ist (Abbildung 9A, Lysat und MOCK-Lysat) und daher klar durch UV induziert wird. Bei dieser Bande muss es sich um eine PCNA-Modifikation handeln, da diese nur im Immunopräzipitat mit PCNA, nicht aber in der Isotyp-Kontrolle nachgewiesen werden kann (Abbildung 9A, IP-Probe versus IP-Isotypkontrolle, siehe Pfeil). Die Detektion mit einem anti-Ubiquitin Ak konnte zudem klären, dass es sich bei dieser höhermolekularen Bande zumindest um Konjugate handeln muss, die unter anderem Ubiquitin enthalten und durch UV generiert worden sind (Abbildung 9B, IP-Probe versus MOCK IP-Probe, siehe Pfeil). Die genaue Natur und Induzierbarkeit dieser höhermolekularen Bande blieb aber dennoch schwierig zu bestimmen, da auch im unbehandelten Präzipitat mit dem anti-PCNA Ak eine deutliche Bande auf dieser Höhe nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9A, MOCK IP-Probe, siehe Pfeil).

Um zu klären, ob es sich bei der höhermolekularen PCNA-Bande um eine Modifikation am Lysin K164 von PCNA handelt, sollten weitere Ubiquitinierungsassays mit der DT40-Mutante PCNA<sup>K164R</sup> durchgeführt werden.



**Abbildung 9: Ko-Immunopräzipitation in DT40Cre1-Zellen**

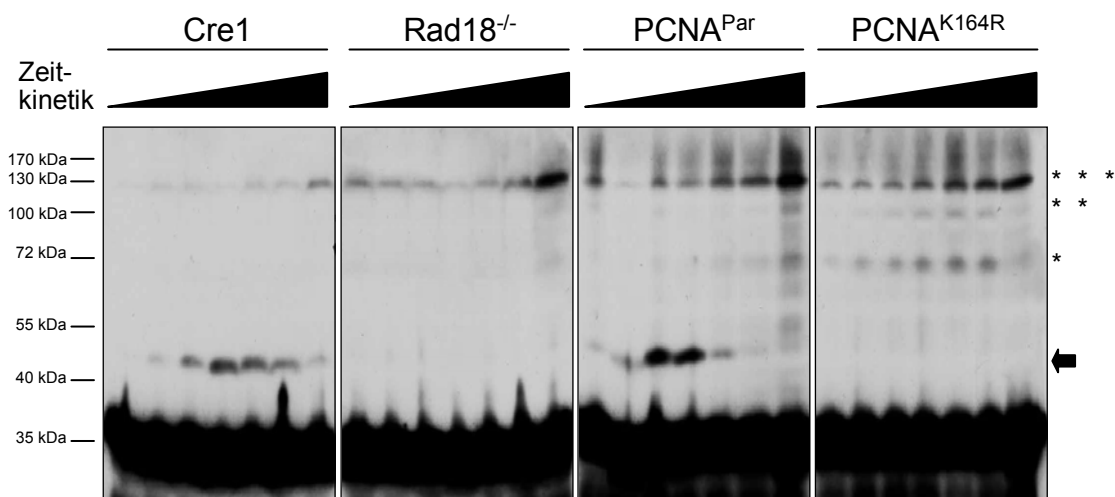
Immunopräzipitate von UV-behandelten sowie unbehandelten Zellen nach einer PCNA-Ko-IP wurden per Western Blot mit Hilfe eines anti-PCNA Ak (A) sowie eines anti-Ubiquitin Ak (B) analysiert. Zudem wurden IP-Isotypkontrollen mitgeführt und die Lysate vor Immunopräzipitation aufgetragen.

Die Pfeile deuten auf das PCNA-Ubiquitinkonjugat bei ca. 72 kDa, das sich in behandelten Zellen mit dem PCNA- und Ubiquitin-Ak nachweisen ließ, jedoch auch in unbehandelten Zellen detektierbar war.



#### 4.1.3.2 Vergleichende Ubiquitinierungsassays mit der DT40-Mutante PCNA<sup>K164R</sup>

Bei der DT40-Mutante PCNA<sup>K164R</sup> handelt es sich um einen speziellen DT40-Zelltyp, der eine Punktmutation im Akzeptorlysin 164 von PCNA aufweist. Da dieses Akzeptorlysin für die Ubiquitinierung durch den Rad6-Weg erforderlich ist, können Zellen von diesem Typ bei einer Blockade der Replikationsgabel weder PCNA am Lysin 164 monoubiquitinieren, noch polyubiquitinieren (Arakawa et al., 2006). Daher eignen sich PCNA<sup>K164R</sup>-Zellen hervorragend als Kontrollzelllinie für Ubiquitinierungsassays die durch den Rad6-Weg reguliert werden. Zudem wurde eine weitere DT40-Mutante des Rad6-Weges, Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen als Referenzzelllinie für PCNA-Monoubiquitinierung eingesetzt. Alle Zelllinien wurden parallel über mehrere Stunden mit einer konstanten MMS-Dosis behandelt und zu bestimmten Zeitpunkten auf ihren Ubiquitinierungsstatus hin überprüft.



**Abbildung 10: Ubiquitinierungsassays in DT40Cre1, Rad18<sup>-/-</sup>, PCNA<sup>Par</sup> und PCNA<sup>K164R</sup>-Zellen**

Proteinextrakte verschiedener DT40-Zelllinien wurden nach folgenden Inkubationszeiten mit 0,09 % MMS analysiert: 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 20h. Es wurden DT40Cre1, DT40Rad18<sup>-/-</sup>, DT40PCNA<sup>Par</sup> und DT40PCNA<sup>K164R</sup>-Zellen miteinander verglichen. Die Banden wurden mit Hilfe eines anti-PCNA Ak detektiert.

◄: monoubiquitiniertes PCNA; \*, \*, \*, \*, \*, \* : höhermolekulare PCNA-Banden

Abbildung 10 zeigt, dass in den zu den beiden DT40-Mutanten zugehörigen parental DT40-Zelllinien, Cre1 und PCNA<sup>Par</sup>, nach MMS-Behandlung PCNA-Monoubiquitinierung induziert wird (Abbildung 10, durch Pfeil markiert). Diese Form der Ubiquitinierung kann, wie zuvor angenommen, bei der PCNA-Mutante<sup>K164R</sup> nicht induziert werden (Abbildung 10, PCNA<sup>K164R</sup>). Auch für den DT40-Zelltyp Rad18<sup>-/-</sup> kann in diesem Experiment keine Monoubiquitinierung von PCNA nachgewiesen werden. Mehrere Versuche mit dieser Zelllinie im Vorfeld hatten gezeigt, dass die Monoubiquitinierung ohne Rad18 erheblich

reduziert wird und je nach Aktivierungsstärke der alternativen E3-Ligase als Monoubiquitinbande mit dem von uns verwendeten PCNA-Ak detektiert werden kann (siehe auch Abschnitt 4.1.2).

Mit den Vergleichswerten der beiden Mutanten des Rad6-Weges kann bewiesen werden, dass es sich bei der niedermolekularen Bande, die auf Höhe von 40 kDa mit dem PCNA-Ak detektiert werden kann, tatsächlich um PCNA-Monoubiquitinierung am Lysin 164 handelt. Es können für alle vier untersuchten Zelllinien höhermolekulare Banden detektiert werden, die zudem noch in der Zelllinie PCNA<sup>K164R</sup> am stärksten induziert werden. Damit ist klar gezeigt, dass es sich bei den Banden um 72 kDa bzw. 100/130 kDa nicht um Ubiquitinierungsbanden am Lysin 164, die durch den Rad6-Weg gesteuert werden, handeln kann.

Zusammenfassend kann für die durch den Rad6-Weg regulierte Monoubiquitinierung von PCNA in Vertebraten ausgesagt werden, dass diese eindeutig im DT40-System nachweisbar ist. Zudem wird sie wesentlich durch Rad18 beeinflusst, kann aber auch ohne Rad18 erfolgen. Das Lysin 164 ist dabei, wie bereits in der Literatur beschrieben, für die Monoubiquitinierung essentiell. Aussagen zur Polyubiquitinierung sind derzeit im DT40-System und basierend auf Western Blot-Auswertungen mit dem von uns verwendeten anti-PCNA Ak nicht möglich. Für die eindeutige Identifikation der höhermolekularen Banden bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

## 4.2 Analysen zu potentiellen Regulationswegen der PCNA-Ubiquitinierung und der Ubc13-Level

---

Neueste Forschungsergebnisse mit humanen Zellen belegen, dass bei DNA-Schädigung das p53-Effektormolekül p21 induziert wird, das wahrscheinlich durch seine Bindung an PCNA dessen Monoubiquitinierung erleichtern und so die TLS regulieren kann (Avkin et al., 2006). Damit konnte jüngst eine Regulation des Rad6-Weges durch p53 gezeigt werden, wodurch das Protein neben seinen vielen Funktionen als z.B. Tumorsuppressor, Regulator des Zellzyklus und der Apoptose eine weitere wichtige regulatorische Funktion bei der Postreplikationsreparatur einnimmt. Viele somatisch hypermutierende Zelllinien weisen auf beiden Allelen für p53 Mutationen auf, doch sind potentielle Unterschiede in der PCNA-Ubiquitinierung von unterschiedlich stark hypermutierenden Zelllinien noch nicht näher untersucht worden.

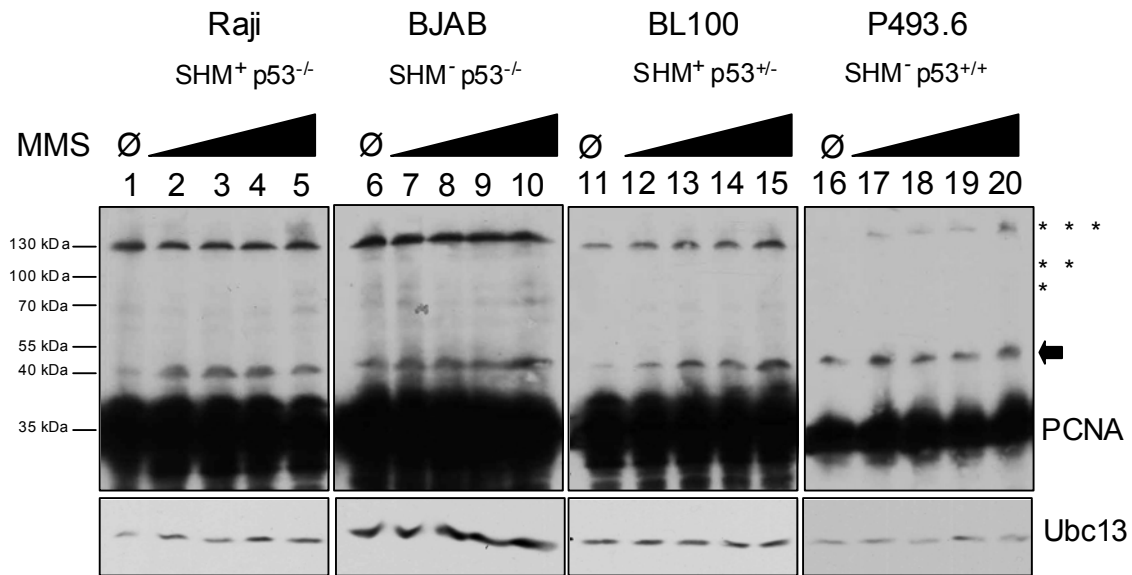
Zudem ist kürzlich eine Regulation von p53 durch Ubc13 in Vertebraten gezeigt worden. Man konnte dabei eine Assoziation von Ubc13 mit dem C-Terminus von p53 nachweisen,

welche dazu führt, dass weniger p53-Moleküle tetramerisiert werden. Dadurch erhöht sich der nukleäre Export aus der Zelle und die Aktivität von p53 nimmt in Folge dessen ab. Auch wurde beschrieben, dass die Menge an Ubc13 einige Zeit nach Bestrahlung von p53-Profizienten HCT-116 Zellen (*human colectoral carcinoma cell line*) herunterreguliert wird, so dass dann wieder p53 im Zellkern akkumuliert und dort als Regulator fungieren kann (Laine et al., 2006).

Die PCNA-Polyubiquitinierung bzw. Beeinflussung des fehlerfreien Pfades des Rad6-Weges wurde im Zusammenhang mit p53 noch nicht charakterisiert. Der Wechsel zum fehlerfreien Pfad der PRR über den Rad6-Weg erfordert die Polyubiquitinierung von PCNA. Dies wird im Menschen durch humanes Ubc13 (E2) zusammen mit MMS2 (UEV) katalysiert (Eddins et al., 2006; Petroski et al., 2007). Da es uns im Vorfeld nicht gelungen ist, eindeutige Banden für Polyubiquitinierung am Lysin 164 von PCNA nachzuweisen, haben wir den potentiellen Einfluss von p53 auf den fehlerfreien Pfad des Rad6-Weges anhand des beteiligten E2-Enzyms Ubc13 näher untersucht.

#### 4.2.1 PCNA-Ubiquitinierung in humanen Zelllinien mit unterschiedlichem Hypermutationspotential und p53-Status

Somatische Hypermutationsassays die im Vorfeld in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden sind, konnten zeigen, dass sich verschiedene B-Zelllinien in ihrer Hypermutationsaktivität stark unterscheiden können (H. Scheller, Doktorarbeit). p53-Gen-Sequenzanalysen ergaben zudem einen unterschiedlichen p53-Status der Zellen (K. Braunschmidt, Doktorarbeit). Diese bereits für SHM und p53-Level charakterisierten B-Zelllinien standen zur Verfügung, um den potentiellen Einfluss auf die Ubiquitinierung von PCNA zu untersuchen. Mit den zuvor etablierten PCNA-Ubiquitinierungsassay war es möglich, auch in diesen Zelllinien monoubiquitiniertes PCNA nachzuweisen (Abbildung 11, siehe Pfeil). Bei den beiden hypermutierenden Zelltypen, Raji und BL100 ist die Induktion der Monoubiquitinierung durch MMS deutlicher zu erkennen als bei den beiden nicht hypermutierenden Zelltypen, BJAB und P493.6. Dies ist eventuell dem höheren Grundlevel an Monoubiquitinierung für BJAB und P493.6 zuzuschreiben. Es lässt sich jedoch in diesen Zellen kein eindeutiger Unterschied im Grad an Monoubiquitinierung erkennen, der auf den p53-Status, und damit auf eine Regulation durch p53 zurückzuführen wäre, wie sie jüngst in der Literatur für nicht B-Zelllinien beschrieben worden ist (Avkin et al., 2006; Haracska et al., 2006).



**Abbildung 11: MMS-Behandlung von verschiedenen, humanen B-Zelllinien**

Extrakte von Raji, BL100, BJAB und P493.6-Zellen wurden nach MMS-Behandlung mit Hilfe eines anti-PCNA Ak analysiert: Spalte 1, 6, 11 und 16) unbehandelt, 2, 7, 12 und 17) 0,0005 % MMS; 3, 8, 13 und 18) 0,001 % MMS; 4, 9, 14 und 19) 0,002 % MMS; 5, 10, 15 und 20) 0,004 % MMS. Es werden Raji, BL100, BJAB und P493.6 -Zellen miteinander verglichen. Die Membranen wurden mit einem anti-PCNA Ak und einem anti-Ubc13 Ak inkubiert.

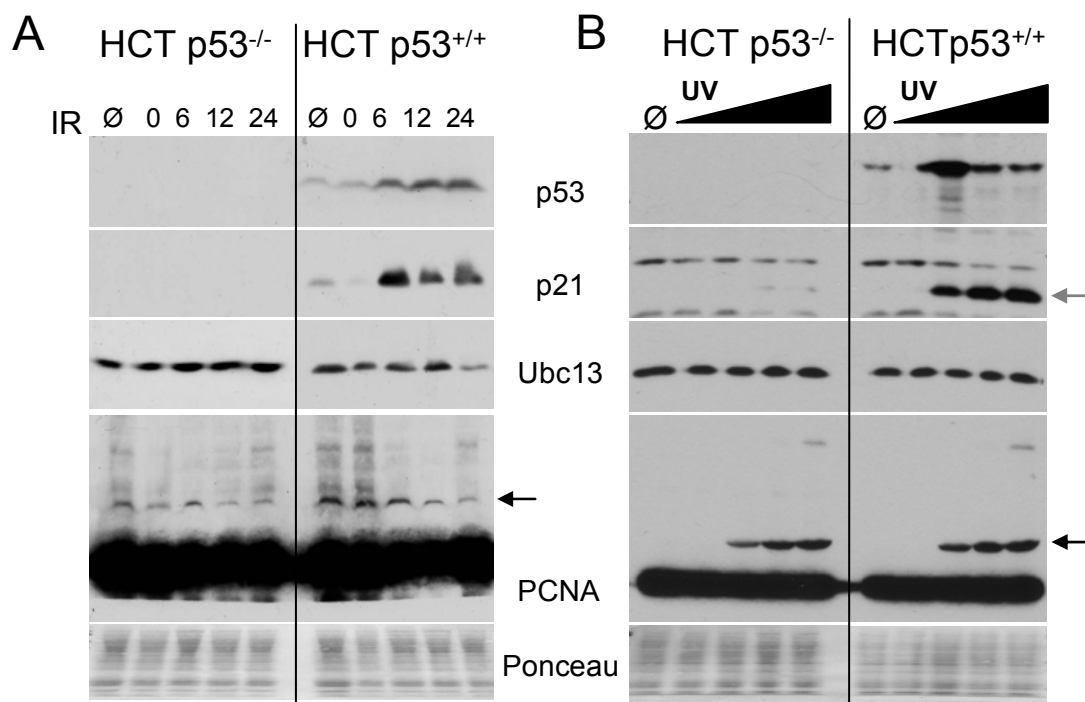
◄: monoubiquitiniertes PCNA; \*, \*, \*, \*, \*, \* : höhermolekulare PCNA-Banden

Bei anschließenden Untersuchungen mit einem anti-Ubc13 Ak, ergab sich keine durch MMS-Behandlung bedingte Veränderung der Ubc13-Level (siehe Abbildung 11, unten). Dies trifft auch für die p53-profiziente Burkitt-Zelllinie P493.6 zu, was erneut eine Abweichung zu den bereits beschriebenen Daten anderer Arbeitsgruppen darstellt, in denen bei DNA-Schädigung von p53<sup>+/+</sup> HCT-Zellen die Ubc13-Level in Abhängigkeit von p53 reduziert wurden (Laine et al., 2006). Dies könnte auf Unterschiede in den verwendeten Zellsystemen oder einer schlechteren Induktion von p53 durch MMS zurückzuführen sein.

#### 4.2.2 PCNA-Ubiquitinierung in p53<sup>+/+</sup> und p53<sup>-/-</sup> HCT-116-Zellen

Daher wurde die Induktion von p53 im HCT-116 Zellsystem, einem genetisch genau definierten und sehr gängigen Modellsystem zur Untersuchung von p53-Effekten, durchgeführt. Durch einen kompletten *knockout* von p53 sind bei der Generierung dieser Zellen aus ursprünglich p53 profizienten HCT-116-Zellen p53<sup>-/-</sup> HCT-116-Zellen hergestellt worden, in welchen p53 nicht mehr exprimiert werden kann (Vogelstein und Kinzler, 1992). Die Zellen werden im Folgenden als p53<sup>+/+</sup> sowie p53<sup>-/-</sup> HCT-Zellen bezeichnet.

Dem Zelltyp entsprechend ließen sich bei den von uns durchgeführten Experimenten in  $p53^{+/+}$  HCT-Zellen durch die Behandlung mit radioaktiver Strahlung (IR) sowohl p53 als auch dessen Effektormolekül p21 induzieren (Abbildung 12A, p53 und p21, rechte Seite). Dies bleibt wie erwartet bei der Behandlung von  $p53^{-/-}$  HCT-Zellen aus, da hier p53 komplett ausgeschaltet worden ist (Abbildung 12A, p53 und p21, linke Seite).



**Abbildung 12: Western Blot Analyse von IR-sowie UV-bestrahlten HCT  $p53^{-/-}$  und HCT  $p53^{+/+}$  Zellen**

A) HCT  $p53^{-/-}$  und HCT  $p53^{+/+}$  Zellen wurden mit IR bestrahlt und nach 0, 6, 12 und 24 Stunden Regeneration bei 37 Grad mittels Western Blot analysiert. Zudem sind unbehandelte Zellextrakte eines anderen, vergleichbaren Experiments dargestellt ( $\emptyset$ ). B) Unbehandelte sowie mit aufsteigenden UV-Dosen behandelte HCT  $p53^{-/-}$  und HCT  $p53^{+/+}$  Zellen: 20, 200, 500 und 1000  $J/m^2$ . Aufgrund einer kleinen Unregelmäßigkeit beim Gellauf sind die p53-Banden von Bahn 2 und 3 auf der rechten Seite des Blots miteinander vereint, doch ist trotzdem eine Induktion von p53 erkennbar.

Beide Membranen wurden mit Antikörpern gegen p21, p53, Ubc13 und PCNA inkubiert. Der schwarze Pfeil deutet auf monoubiquitiniertes PCNA bei ca. 40 kDa, der graue Pfeil markiert die spezifische p21-Bande. Als Ladekontrollen sind die Ponceau-Färbungen dargestellt.

Die Ubc13-Proteinmenge nach IR-Behandlung  $p53$ -profizienter Zellen nimmt wie bereits in der Literatur beschrieben (Laine et al., 2006), 24 h nach IR-Behandlung ab (Abbildung 12A, rechte Seite, Ubc13). Es ist hier keine Förderung der PCNA-Monoubiquitinierung durch die Induktion von p53 zu erkennen, wie sie kürzlich in der Literatur beschrieben worden ist (Avkin et al., 2006). Die IR-Behandlung  $p53$  profizienter HCT-Zellen führt sogar zur Abnahme der PCNA-Monoubiquitinierung (Abbildung 12A, rechte Seite, PCNA Inkubation). Dies ist eventuell dem bereits hohen Grundlevel an Monoubiquitinierung in unbehandelten Zellen zuzuschreiben. Vor allem könnte dies durch die Art der

Schadensinduktion über IR-Behandlung bedingt sein, die bei diesen Versuchsreihen eingesetzt wurde. Daher sollte als nächstes die Ubiquitinierung nach UV, die Methode der Schadensinduktion wie sie bereits in der Publikation verwendet wurde (Avkin et al., 2006), untersucht werden.

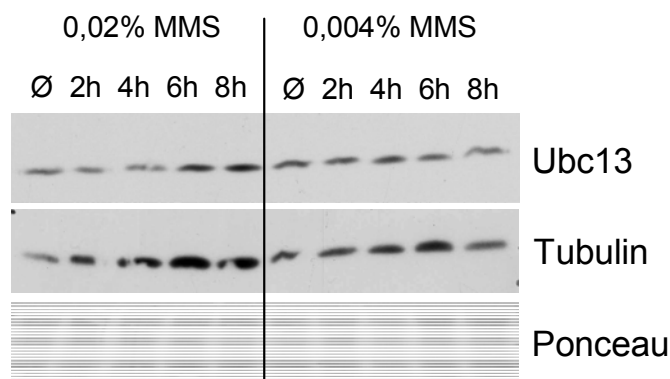
Auch nach UV-Behandlung wird entsprechend dem Zellstatus der HCT-Zellen sowohl p53 als auch dessen Effektormolekül p21 induziert (Abbildung 12B, p53 und p21 Inkubation). Die UV-Behandlung hat sowohl in p53-profizienten als auch in p53-defizienten HCT-Zellen keinen Einfluss auf die Ubc13-Level (Abbildung 12B, Ubc13). Auch gibt es keine Regulation der PCNA-Monoubiquitinierung in Abhängigkeit vom p53-Status (Abbildung 12B, PCNA). Damit scheint die Regulation der PCNA-Monoubiquitinierung in HCT-Zellen anders zu verlaufen als in Lungenkrebszellen oder Osteosarkomzellen (Avkin et al., 2006).

### 4.2.3 Untersuchungen zur Regulation von Ubc13 in Vertebraten

Die Polyubiquitinierung von PCNA aktiviert in Vertebraten und Hefen einen Pfad, der die Zellen vor Mutationen schützt, die durch den alternativen Pfad der Reparatur mit TLS-Polymerasen entstehen würden (Chiu et al., 2006). Es wurde bereits in Hefen gezeigt, dass dieser Wechsel, der durch die Behandlung mit einem DNA-schädigenden Agens induziert wird, auch die Menge des beteiligten E2-Enzyms (Ubc13) beeinflussen kann (Xiao et al., 2000). In Vertebraten ist dies jedoch noch nicht beschrieben worden.

#### 4.2.3.1 Versuche zur Induzierbarkeit von Ubc13 durch MMS

Daher wurden DT40Cre1-Zellen über mehrere Stunden mit MMS behandelt und der Einfluss auf das Protein Ubc13 durch Western Blot untersucht. Für beide eingesetzten Konzentrationen der Droge blieb die Menge an Ubc13 auch nach langen Inkubationszeiten von bis zu 8 h relativ konstant, sofern geringe Beladungsunterschiede berücksichtigt werden (Abbildung 13). Auch bei mehrfacher Wiederholung dieses Experiments konnte Ubc13 nicht durch MMS induziert werden, so dass wir im nächsten Schritt ein Enzym zur Schadensinduktion eingesetzt haben, das in B-Zellen aufgrund seiner Schlüsselfunktion in größeren Mengen vorkommt und daher in Hinblick auf die Biologie von B-Zellen zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen könnte.



**Abbildung 13: Western Blot Analyse von DT40Cre1-Zellen nach Behandlung mit MMS**

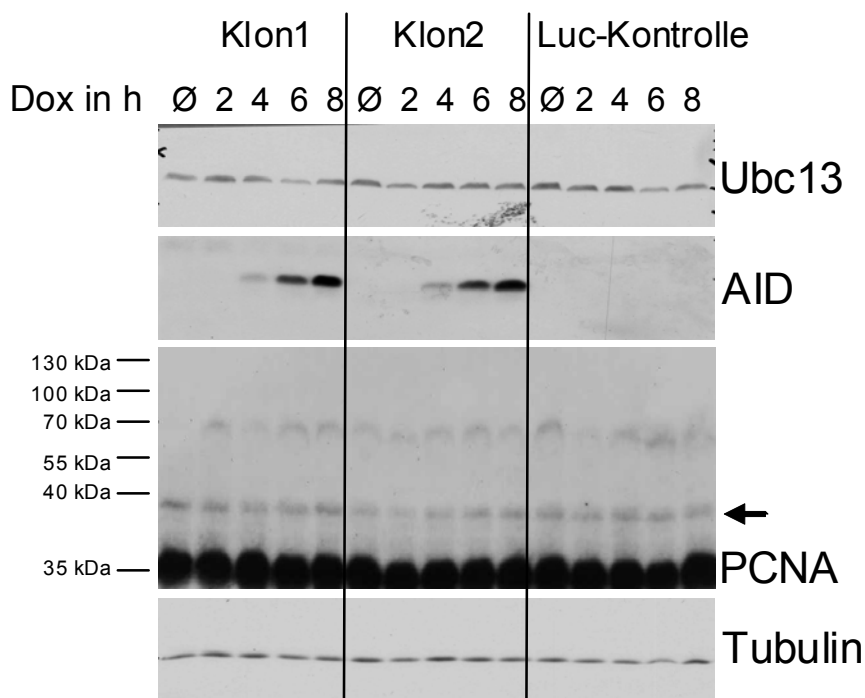
Western Blot Analyse von unbehandelten DT40Cre1-Zellen sowie nach Behandlung mit 0,02 % MMS und 0,04 % MMS für 2h, 4h, 6h und 8h. Die Membran wurde mit einem anti-Ubc13 Ak und einem anti-Tubulin Ak inkubiert. Zudem ist die *Ponceau*-Färbung dargestellt.

#### 4.2.3.2 Versuche zur Induzierbarkeit von Ubc13 durch AID

AID ist als Keimzentrumsfaktor beschrieben, der in reifen B-Zellen in hohen Mengen exprimiert wird und durch seine Cytidineaminase-Aktivität Läsionen in die DNA einführen kann (Muramatsu et al., 1999). Durch parallel ablaufende Prozesse werden diese weiter modifiziert und können zu verschiedenen Endprodukten führen (Rada et al., 2004). Jüngst ist es gelungen eine Beteiligung des Rad6-Weges bei der Regulation der SHM in DT40-Zellen experimentell zu belegen (Arakawa, 2006; Bachl et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob bei dem Prozess der SHM durch eine Überexpression von AID der fehlerfreie Pfad des Rad6-Weg induziert wird, wurden aus DT40AID<sup>-/-</sup>-Zellen zwei stabile DT40-Einzelzellklone (EZK) generiert, in denen sich AID konditional bei Doxycyclinzugabe überexprimieren lässt. Zudem wurde eine Kontrollzelllinie hergestellt, in der statt AID Luciferase überexprimiert werden kann. Anschließend wurden die Zellen per Western Blot Analyse auf die Induktion von AID, Menge an Ubc13 sowie PCNA-Ubiquitinierung hin untersucht. Abbildung 14 zeigt, dass in beiden EZK ab einer Inkubationszeit von sechs Stunden mit Doxycyclin ein gutes Expressionslevel für AID erreicht werden kann. In der Luciferase-Kontrolle lässt sich dagegen, wie erwartet, kein AID-Protein detektieren.

Die AID-Überexpression scheint keinen Effekt auf die Menge an Ubc13 oder den Grad an PCNA-Ubiquitinierung zu haben (Abbildung 14, Ubc13 und PCNA). Da die SHM eindeutig von AID initiiert und durch den Rad6-Weg reguliert wird, hätte man einen Anstieg der Monoubiquitinierung erwartet. Doch könnte die Menge von AID-induzierten Schäden evtl. nicht ausgereicht haben, um Effekte auf Proteinebene nachzuweisen.



**Abbildung 14: AID-Überexpression in verschiedenen DT40-Einzelzellklonen**

Western Blot Analyse von zwei verschiedenen DT40-Einzelzellklonen die AID konditional überexprimieren können und der zugehörigen Luc-Kontrolle nach Dox-Behandlung. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen Ubc13, AID, PCNA sowie Tubulin als Ladekontrolle inkubiert.

←: monoubiquitiniertes PCNA

#### 4.2.4 Untersuchungen zur Korrelation der SHM mit der Expression von Ubc13, Rad18 und Rad6

Zellen mit hoher Rate an SHM ziehen die fehlerhafte Reparatur der fehlerfreien Reparatur vor, um möglichst viele Mutationen im Ig-Locus zu induzieren. Daher wurden verschiedene humane Zelllinien, die im Vorfeld durch ihre unterschiedliche Aktivität für SHM charakterisiert worden sind (H. Scheller, Doktorarbeit), auf einen potentiellen Einfluss der Expression der wichtigsten Mitglieder des Rad6-Weges untersucht.

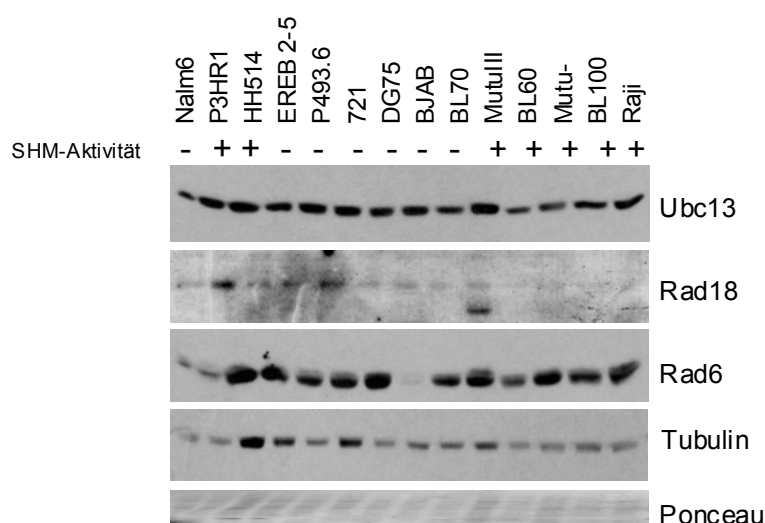
Nalm6, 721, Ereb2-5, P493.6, DG75 BL70 und BJAB-Zellen wurden als nicht hypermutierende Zelllinien beschrieben, während für P3HR1, HH514, Mutu<sup>-</sup>, MutuIII, BL100, BL60 sowie Raji-Zellen eine SHM-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Mittels einer Western Blot Analyse wurden die Proteinlevel von Rad6, Rad18 und Ubc13 untersucht (siehe Abbildung 15).

Die Untersuchung der Proteinmengen von Ubc13 und Rad6 ergaben zwar für einzelne Zelllinien auf den ersten Blick Unterschiede, doch ist dies wahrscheinlich eher auf einen Randeffect des Western Blots oder eine ungleiche Beladung zurückzuführen und zeigt keine Korrelation mit der SHM-Aktivität (Abbildung 15, Tubulin und Ponceau). Durch die Inkubation mit einem anti-Rad18 Ak ließ sich nur eine vage Aussage machen, da das



Signal insgesamt relativ schwach ist. Jedoch konnte in einer unabhängigen Untersuchung des Einflusses der SHM auf Rad18 kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Daher lassen sich aus dieser Western Blot Analyse keine allgemein gültigen Aussagen des Einflusses der SHM auf Rad6, Rad18 oder Ubc13 ableiten.

Es wurden zudem mRNA-Analysen von verschiedenen Burkitt-Zelllinien mit einer quantitativen real-time PCR durchgeführt, um eine potentielle Beeinflussung von Ubc13 auf mRNA Ebene nachzuweisen. Auch hier konnten keine klaren Unterschiede in der Ubc13-mRNA-Expressionsrate, die sich auf unterschiedliche SHM-Aktivitäten zurückführen lassen, aufgezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15: Western Blot Analyse verschiedener Burkitt-Zelllinien**

Western Blot Analyse von sieben hypermutierender Zelllinien (+) sowie sieben nicht hypermutierender Zelllinien (-). Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen Ubc13, Rad18, Rad6 sowie Tubulin als Ladekontrolle inkubiert. Zudem ist die Ponceau-Färbung dargestellt.

In den von uns durchgeführten Analysen zu potentiellen Regulationswegen ließ sich weder eine eindeutige Beeinflussung der Ubiquitinierung durch die Aktivität für SHM noch durch p53-Induktion aufzeigen. Auch eine Regulation einzelner Mitglieder des Rad6-Weges durch DNA-Schäden, AID oder SHM-Aktivität konnte nicht belegt werden.

## 4.3 Funktionelle Analyse von Ubc13 bei der Ig-Diversifizierung in DT40-Zellen

---

### 4.3.1 Inaktivierung eines Ubc13-Allels in DT40Cre1-Zellen

Bei kompletter Inaktivierung der Ubiquitinligase Rad18 konnte bereits in unserer Arbeitsgruppe eine Verringerung der SHM-Rate in DT40-Zellen nachgewiesen werden (Bachl et al., 2006). Damit ist klar, dass der Rad6-Weg für die Regulation der SHM von Bedeutung ist, jedoch konnte noch nicht geklärt werden, welche Art der PCNA-Ubiquitinierung dafür erforderlich ist. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss des Pfades, der über PCNA-Polyubiquitinierung gesteuert wird, bei der Ig-Diversifizierung bzw. DNA-Reparatur genauer untersucht werden. Da die daran beteiligte E3-Ligase zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert war, wurde die Funktion des beteiligten E2-Enzyms Ubc13 näher bestimmt. Dazu sollte Ubc13 in DT40-Zellen gerichtet inaktiviert werden.

Daher wurde ein *Ubc13-targeting*-Vektor generiert, welcher durch seine homologen Bereiche am 3' und 5' Arm stabil in den genomischen Ubc13-Lokus von DT40-Zellen integrieren kann (Abbildung 16A). Bei Integration dieses Konstruktes wird die komplette genetische Information von Exon 2, 3 und teilweise Exon 4 durch die Resistenzkassette des Vektors ersetzt, wodurch ein Allel des endogenen Ubc13-Gens ausgeschaltet wird, sowie die Zellen resistent gegen das Antibiotikum werden. Gleichzeitig kann bei Integration des *targeting*-Vektors, dieser über dabei eingeführte zusätzliche Sequenzen anhand eines 2500 bp großen PCR-Produktes nachgewiesen werden (Abbildung 16A, rote Pfeile).

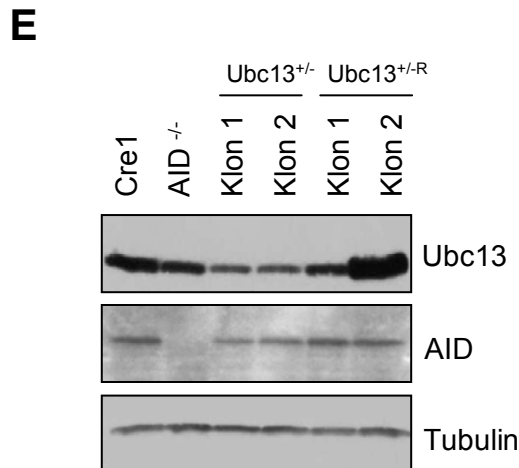
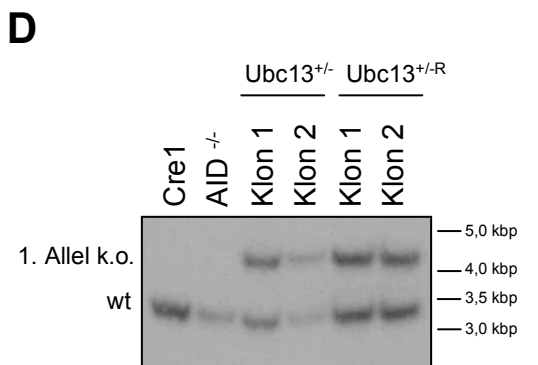
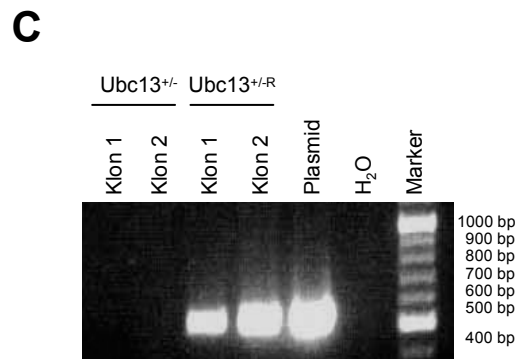
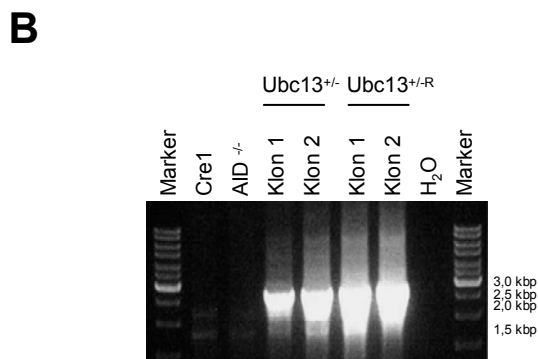
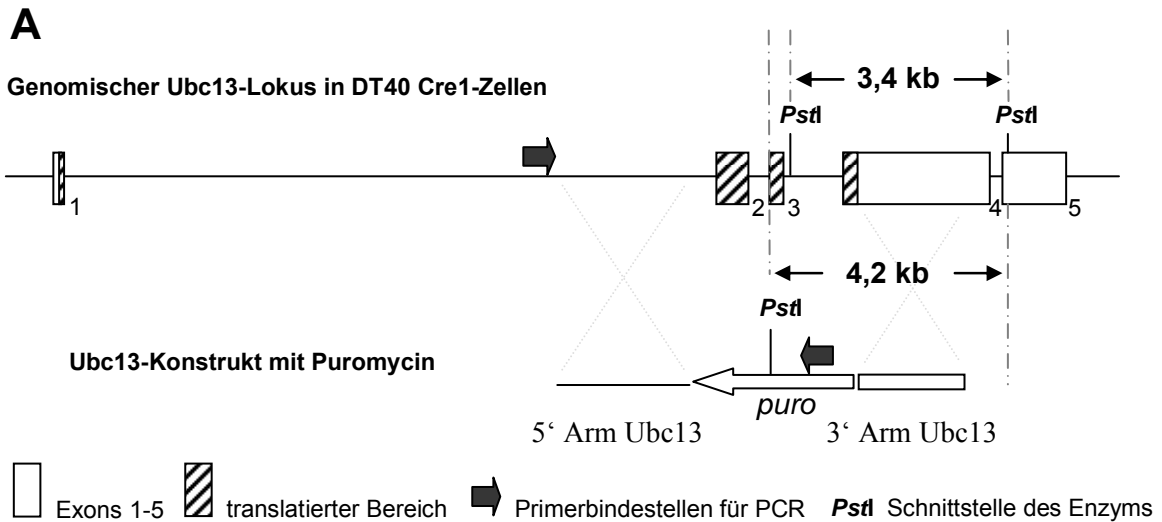
Die Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels konnte so mit einer hohen Effizienz erreicht werden, so dass mehrere DT40-Einzelzellklone entstanden sind, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert und damit im Vergleich zur parentalen Cre1-Zelllinie weniger Ubc13-Protein exprimiert haben (Ubc13<sup>+/-</sup>-Klone). Die Inaktivierung des zweiten Ubc13-Allels sollte durch einen *targeting*-Vektor mit einer Resistenzkassette gegen ein weiteres Antibiotikum durchgeführt werden, war aber trotz vieler experimenteller Ansätze nicht erfolgreich. Allerdings zeigten Ubc13<sup>+/-</sup>-Klone bereits in ersten Analysen eine deutlich verringerte Rate an Ig-Genkonversion (GC), so dass zur genauen Untersuchung dieses Effektes ein komplettes experimentelles Zellset im genetischen Cre1-Hintergrund generiert wurde (im folgenden Zellset<sup>Ig-GC</sup> genannt).

Dazu wurde in zwei unabhängigen Ubc13<sup>+/-</sup>-Klonen durch Transfektion mit einem von loxP-Stellen flankierten cDNA-Überexpressionsvektor (Arakawa et al., 2001) Ubc13 wieder rekonstituiert (Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klone). Mit der Rekonstitution wurden die Zellen resistent

gegen Mycophenolsäure. Das so generierte Zellset<sup>Ig-GC</sup> wurde zunächst durch PCR auf die gerichtete Integration des Ubc13-Konstruktes sowie auf das Vorhandensein des Ubc13-Überexpressionsvektors überprüft. Abbildung 16B zeigt für die beiden Ubc13<sup>+/-</sup>-Klone und Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klone eine klare Bande bei ca. 2500 bp, welche die gerichtete Integration des Ubc13-Konstruktes bestätigt. Diese Bande ist bei den untransfizierten, parental Cre1 sowie AID<sup>-/-</sup> Zellen wie erwartet nicht nachweisbar. In Abbildung 16C ist das Produkt der cDNA-Expressionskassette für Ubc13 als deutliche Bande bei ca. 500 bp in den beiden rekonstituierten Klonen und bei der Positivkontrolle der PCR, dem zur Überexpression verwendeten Plasmid, zu erkennen. Diese Bande ist bei den nicht rekonstituierten Zellen, Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon1 und Klon2 sowie in der Kontrolle nicht detektierbar.

Zusätzlich wurden die generierten Zelltypen durch eine Southern Blot Analyse auf gerichtete Integration des *targeting*-Vektors in das erste Ubc13-Allel kontrolliert. Dies war durch die Einführung einer zusätzlichen Schnittstelle des Enzyms *PstI* möglich, die das Produkt der DNA-Spaltung mit *PstI* von 3,4 kbp auf 4,2 kbp erhöht hat (Abbildung 16A, *PstI*). Auch hier erkennt man eine deutliche zweite Bande für die Zelltypen Ubc13<sup>+/-</sup> und Ubc13<sup>+/-R</sup> die bei den Cre1-Zellen und AID<sup>-/-</sup>-Zellen fehlt und somit die gerichtete Integration in das endogene Ubc13-Allel beweist (Abbildung 16D).

Neben dem Nachweis des *targeting*-Vektors auf genetischer Ebene wurde das Zellset durch Western Blot Analyse auf unterschiedliche Protein-Expressionslevel für Ubc13 untersucht. Durch den Einsatz dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Ubc13-Proteinlevel in den beiden heterozygoten Zellklonen reduziert werden (Abbildung 16E). Durch Rekonstitution mit dem Überexpressionsvektor nimmt die Menge des exprimierten Ubc13-Proteins wieder deutlich, aber im unterschiedlichen Ausmaß, zu (Abbildung 16E). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der Überexpressionsvektor in den beiden Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klonen an verschiedenen Stellen im Genom integriert hat, die transkriptionell unterschiedlich gesteuert werden, oder eine unterschiedliche Kopienzahl des Überexpressionvektors vorhanden ist.



**Abbildung 16. Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in DT40Cre1-Zellen**

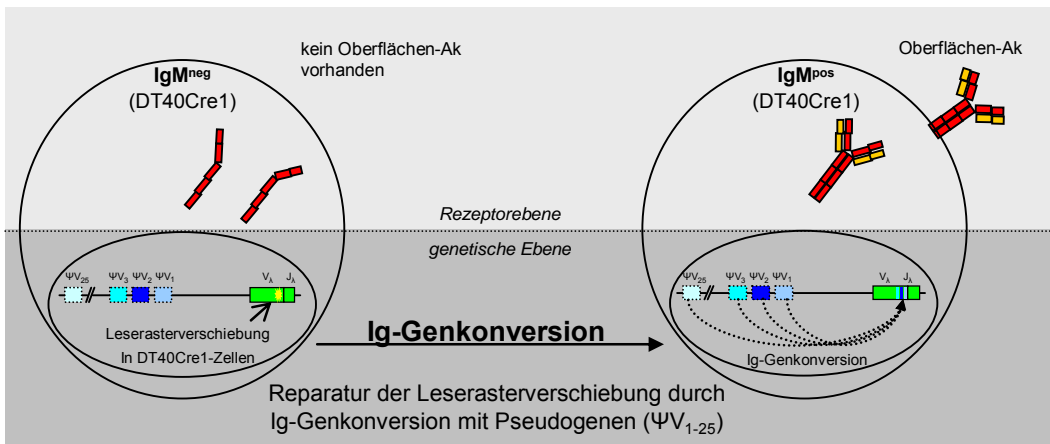
A) Schematische Darstellung des endogenen Ubc13-Lokus in DT40-Zellen und des verwendeten Ubc13-targeting-Vektors zum *knockout* des ersten Ubc13-Allels; B) Nachweis der gerichteten Integration in das erste Ubc13-Allel durch PCR; C) Nachweis des Ubc13-Überexpressionsvektors durch PCR; D) Überprüfung des Zellsets<sup>Ig-GC</sup> durch Southern Blot Analyse nach Spaltung mit *PstI*. Durch das *targeting* erhöht sich das Produkt von 3,4 kbp auf 4,2 kbp; E) Überprüfung der Ubc13-Expressionslevel im generierten Zellset<sup>Ig-GC</sup> durch Western Blot Analyse. Inkubationen der Membran mit einem Antikörper gegen Ubc13, AID und der Ladekontrolle Tubulin sind dargestellt.

### 4.3.2 Rolle von Ubc13 bei der Ig-Genkonversion

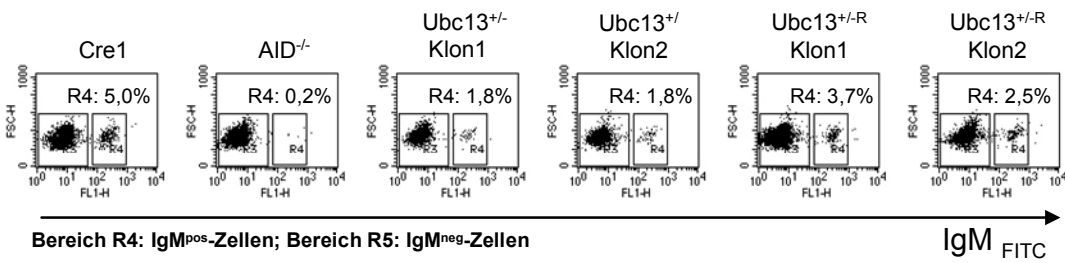
DT40Cre1-Zellen besitzen in den VJ-lambda Gensegmenten der leichten Kette ihrer Ig eine Insertion von einer Base. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung, wodurch diese Zellen keinen IgM-Ak mehr auf ihrer Oberfläche exprimieren können (IgM<sup>neg</sup>-Zellen) (Buerstedde et al., 1990). Außerdem führen DT40Cre1-Zellen konstitutiv Ig-Genkonversion durch, was zu einer genetischen Rekombination der VJ-Gensegmente mit Bereichen der 25 vorhandenen Pseudogene der leichten Kette führt, die alle weiter oberhalb im Genom liegen. Dadurch kann die Leserasterverschiebung aufgehoben werden (siehe Abbildung 17A) und es entstehen B-Zellen, die wieder den Oberflächen-Ak IgM exprimieren (IgM<sup>pos</sup>-Zellen). Dies ermöglicht es, im DT40Cre1-System die Ig-Genkonversionsrate mit Hilfe eines anti-IgM<sub>FITC</sub> Ak zu visualisieren. Um durch den Einsatz dieser Methode alle Genkonversionsereignisse detektieren zu können, ist es erforderlich von einer anfangs IgM<sup>neg</sup>-Population auszugehen (Buerstedde und Takeda, 1991).

Zur Untersuchung der Rolle von Ubc13 bei der Ig-GC wurden aus den IgM<sup>neg</sup>-Zellfraktionen aller Zelllinien des Zellsets<sup>Ig-GC</sup> jeweils 25 EZK generiert und diese nach sechswöchiger Kultivierung analysiert. Abbildung 17B zeigt einzelne, repräsentative FACS-Bilder der verschiedenen Zelltypen die in Abbildung 17C als Übersicht aller EZK bis zu einer Maximalrate von 15% IgM<sup>pos</sup>-Zellen graphisch zusammengefasst sind. Wie erwartet, besitzt die parentale Zelllinie DT40Cre1, die in der Literatur als Zelltyp mit hoher Genkonversionsrate beschrieben ist (Buerstedde et al., 1990), den größten Anteil an IgM<sup>pos</sup>-Zellen der durchschnittlich bei ca. 4 % liegt. Der Zelltyp AID<sup>-/-</sup>, der in diesem Experiment als Negativkontrolle fungiert, besitzt hingegen im Mittel einen Prozentsatz von ca. 0,5 % IgM<sup>pos</sup>-Zellen. Da die Ig-GC als Prozess beschrieben wurde, der ohne AID nicht initiiert werden kann (Arakawa et al., 2002), ist diese geringe Restrate von knapp über 0 % wahrscheinlich auf eine unspezifische Färbung des zur Analyse verwendeten Ak zurückzuführen. Die eindeutige Verringerung des Anteils an IgM<sup>pos</sup>-Zellen zwischen Positivkontrolle und Negativkontrolle ist auch bei der graphischen Darstellung der FACS-Daten deutlich zu erfassen. Zusätzlich ist auch in den beiden Ubc13<sup>+/-</sup>-Klonen eine deutliche Reduktion des Anteils an IgM<sup>pos</sup>-Zellen mit 1,4 % für Klon 1 und 1,5 % für Klon 2 gegenüber Cre1-Zellen zu sehen.

A



B



C

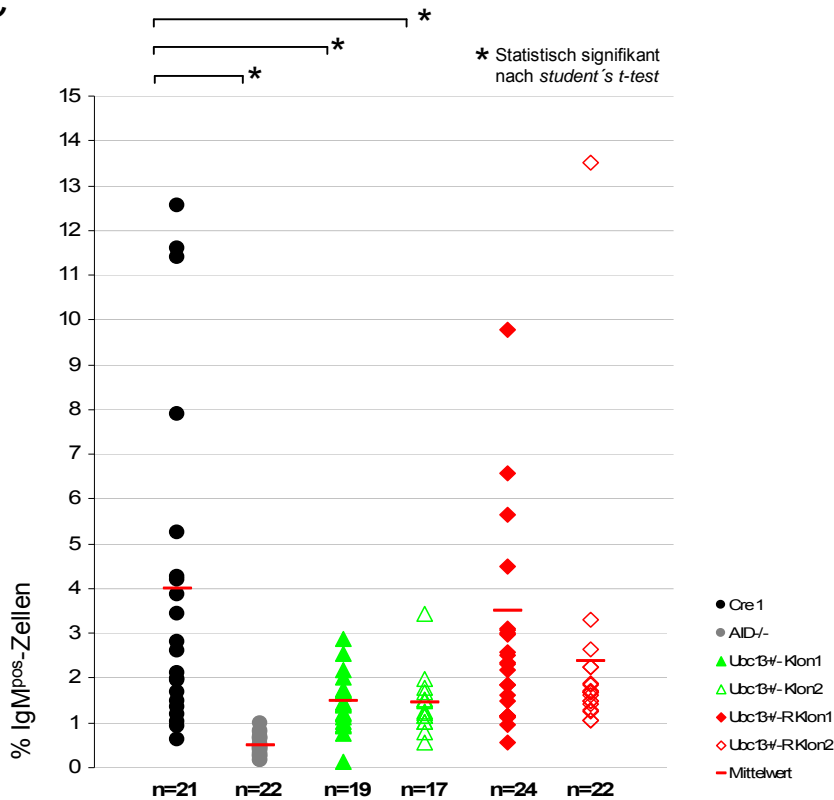


Abbildung 17: Ig-Genkonversionsassay mit dem Zellset<sup>Ig-GC</sup>

A) Schema der Ig-Genkonversion in DT40Cre1-Zellen. Details siehe Text; B) Repräsentative FACS-Daten jeweils eines EZK der Zelllinien DT40Cre1, AID<sup>-/-</sup>, Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 1 und Klon 2 sowie beider Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klone; C) Für einen besseren Überblick der Daten aus dem Ig-Genkonversionsassay sind alle EZK bis maximal 15 % IgM<sup>pos</sup>-Zellen dargestellt. Zudem wird der Mittelwert gezeigt und die Daten wurden statistisch ausgewertet. Ein EZK des Zelltyps Ubc13<sup>+/-R</sup> Klon 1 lag bei 21% IgM<sup>pos</sup> Zellen und ist daher nicht abgebildet.

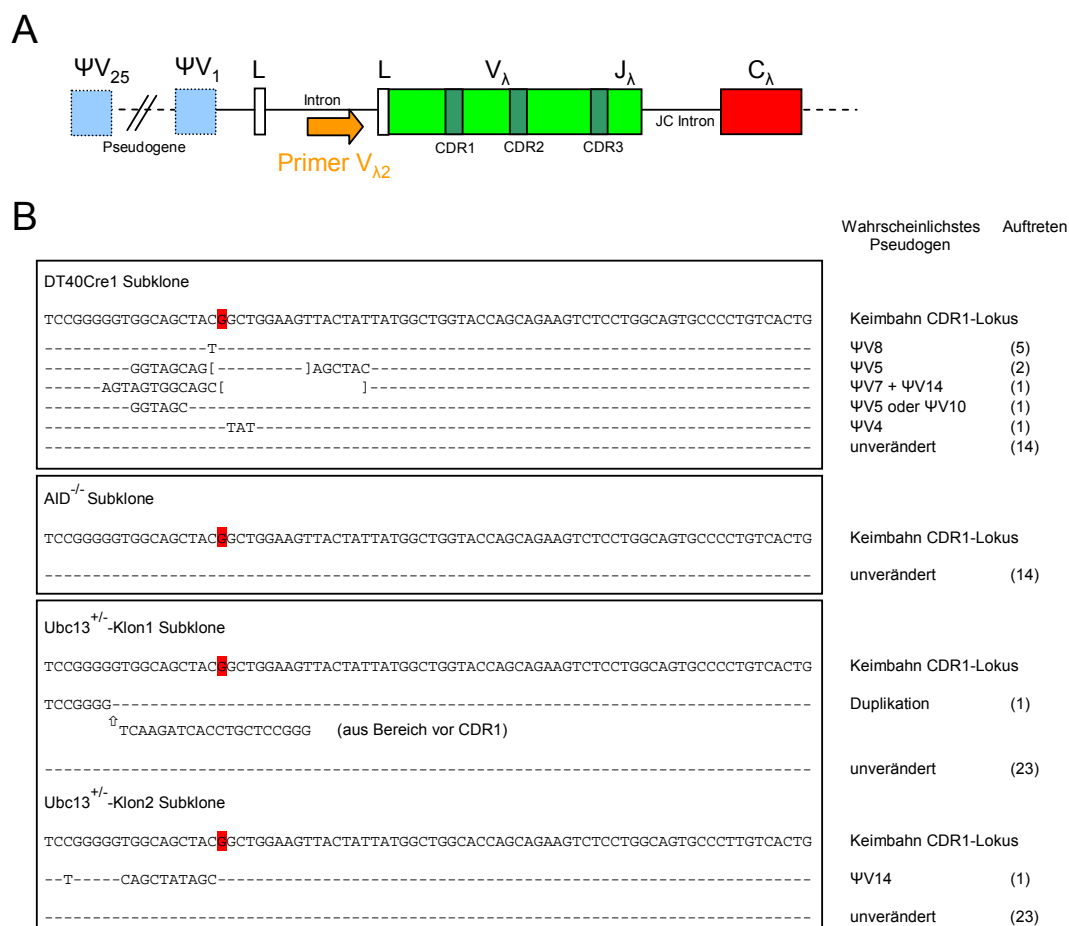
Diese Reduktion zeigt sich auch bei statistischer Auswertung der Gesamtdaten des Assays mit einem *student's t-test*. Dieser ergibt bei Vergleich von Cre1 mit AID<sup>-/-</sup> sowie bei Vergleich von Cre1 mit beiden heterozygoten Klonen einen Wert von  $p < 0,003$  und kann somit als statistisch hoch signifikant eingestuft werden (Abbildung 17C, mit \* markiert). Der Effekt wird durch die Rekonstitution von Ubc13 mit einem Anteil an IgM<sup>pos</sup>-Zellen von 3,6 % für Klon 1 und 2,4 % für Klon 2 klar abgemildert. Auch der statistische Abgleich von Cre1 und den beiden rekonstituierten Klonen kann verdeutlichen, dass zwischen diesen Zelltypen kein signifikanter Unterschied existiert ( $p > 0,5$ , Daten nicht dargestellt). Zusammengefasst zeigt dies, dass die Dosis von Ubc13 für die Rate an Ig-GC von Bedeutung ist.

Um die FACS-Daten des Ig-Genkonversionsassays auf Genomebene zu überprüfen, wurden DNA-Sequenzanalysen durchgeführt. Durch längere Kultivierung aller Zelltypen wurde dazu zunächst der Anteil an IgM<sup>pos</sup>-Zellen in den EZK erhöht, so dass mehr Ig-Genkonversionsereignisse pro Sequenzierung untersucht werden konnten. Dann wurde der VJ-Abschnitt eines repräsentativen EZK pro Zelltyp per PCR amplifiziert und in einen Vektor kloniert um mit dessen Hilfe in Bakterien vermehrt und als einzelne Subklone sequenziert zu werden. Diese erfolgte mit dem Primer  $\lambda 2$  nach der *ABI BigDye Kit Version 3.1*-Methode auf einem Kapillarsequencer und lieferte gute Sequenzdaten für einen Bereich bis ca. 900 bp unterhalb der Primerbindestelle (siehe Schema in Abbildung 18A). Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm *Clustal W* miteinander abgeglichen, und ergaben nur Unterschiede im CDR1-Bereich (*complementarity determining regions*), einer hypervariablen Region von Ak. Es wurden je 24 Sequenzen des Zelltyps Cre1, AID<sup>-/-</sup>, Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 1 und Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 2 analysiert.

Abbildung 18B zeigt ganz oben einen Ausschnitt aus der Keimbahnsequenz von Cre1-Zellen. Rot markiert ist die Leserasterverschiebung, die dazu führt, dass die Zellen IgM<sup>neg</sup> sind. Darunter sind die Sequenzen des CDR1-Bereichs der verschiedenen Cre1-Subklone abgebildet, welche durch Sequenzabgleich mit den publizierten DT40-Pseudogenen (Reynaud et al., 1987) demjenigen zugeordnet werden konnten, mit dem eine Rekombination am wahrscheinlichsten stattgefunden hat. In 10 von insgesamt 24 untersuchten Sequenzen konnten durch Abgleich mit der Keimbahn *Ig-GC-tracts* nachgewiesen werden, die in Abbildung 18B dem entsprechenden Pseudogen zugeordnet sind. Dies entspricht einer Ig-GC Rate in Cre1-Zellen von 42 % und stimmt mit dem Anteil an IgM<sup>pos</sup>-Zellen laut FACS-Färbung überein. Wie erwartet, konnten für den Zelltyp AID<sup>-/-</sup> in allen 24 untersuchten DNA-Sequenzen keine *Ig-GC-tracts* nachgewiesen werden. Damit

konnten PCR-Fehler bei der zur Sequenzierung durchgeführten Klonierung weitestgehend ausgeschlossen werden. Die beiden heterozygoten Klone zeigten bei Sequenzabgleich von 24 Subklonen mit der Keimbahn jeweils eine veränderte Sequenz. Beim Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 1 ließ sich lediglich eine Duplikation aus dem Bereich vor der CDR1-Region feststellen, welche als Nebenprodukt der HR bei der Ig-Genkonversion entstanden sein könnte (Goossens et al., 1998). Beim Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 2 wurde wahrscheinlich mit dem Pseudogen  $\Psi_{V14}$  rekombiniert. Die Ig-GC Rate für die Subklone dieses Zelltyps entspricht laut Sequenzdaten 4,2 % und passt gut zu den FACS-Daten.

Die durchgeführten Ig-GC FACS-Assays sowie die prozentual bestimmten Anteile an *Ig-GC-tracts*, die anhand der Sequenzdaten ermittelt werden konnten, zeigen beide unabhängig voneinander, dass die Ubc13-Proteinmenge in DT40-Zellen den Prozess der Ig-GC substanziiell beeinflusst.



**Abbildung 18: DNA-Sequenzanalyse des Bereichs CDR1 der EZK aus dem Ig-Genkonversionsassay**

A) Schematische Darstellung des VJ<sub>λ</sub>-Lokus in DT40-Cre1 Zellen mit der Primerbindestelle für V<sub>λ2</sub>.

B) Vergleich der DNA Sequenzen von je 24 Klonen der Zelltypen DT40Cre1, AID<sup>-/-</sup>, Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 1 und Klon 2. Zudem ist das wahrscheinlichste Pseudogen, das in den VJ-Lokus rekombiniert hat, und die Häufigkeit des Auftretens dieser Sequenz vermerkt.



### 4.3.3 Einfluss von Ubc13 auf Proliferation und DNA-Reparatur

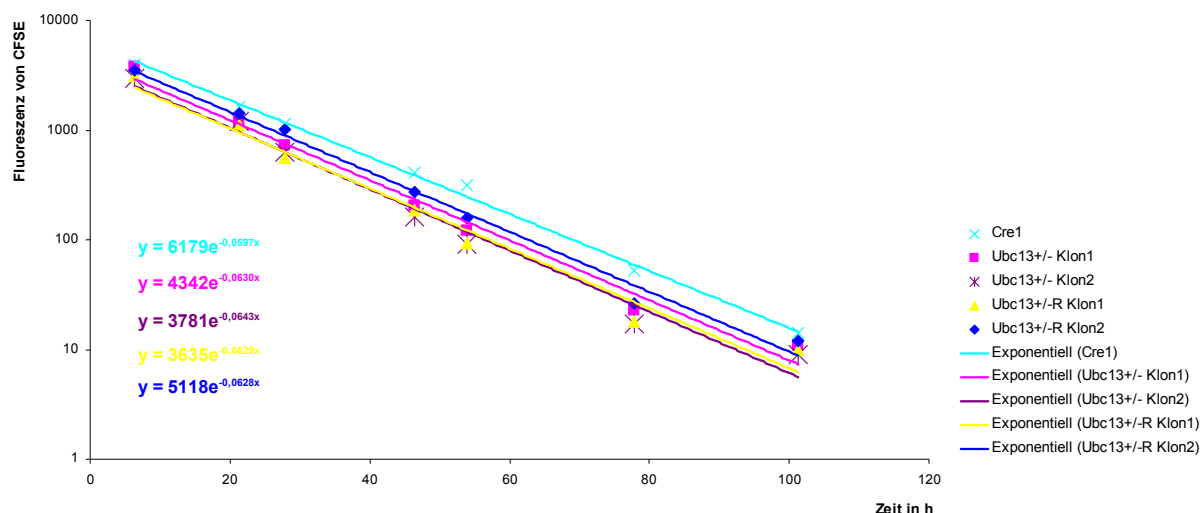
Um auszuschließen, dass der Effekt von Ubc13 bei der Ig-GC auf Proliferationsunterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen zurückzuführen ist, wurden die Zelllinien des Zellsets <sup>Ig-GC</sup> auf potentielle Unterschiede in der Proliferation hin untersucht.

Dazu wurde ein Proliferationsassay auf Grundlage des Farbstoffes Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA) verwendet. CFDA ist in seiner Grundform ein nicht fluoreszierender Farbstoff, welcher aufgrund seiner chemischen Struktur in Zellen hinein diffundieren kann (Quah, 2007). Beim Eindringen des Farbstoffes wird dieser chemisch modifiziert, was dazu führt, dass der grün fluoreszierende Farbstoff Diacetat Succinimidyl Ester (kurz CFSE) entsteht, der eine geringe Membranpermeabilität aufweist und damit in den Zellen erhalten bleibt. Man geht davon aus, dass die Zellen durch CFSE irreversibel gefärbt werden und dass der Farbstoff bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt wird, so dass die Abnahme der Fluoreszenz als Maß zur Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit verwendet werden kann.

Alle Zelltypen wurden im Anschluss an die Färbeprozedur per FACS-Analyse untersucht um den initialen Zustand nach der Färbung festzuhalten. Durch wiederholte FACS-Analysen in den darauf folgenden Tagen konnte die Fluoreszenzveränderung über die Zeit ermittelt werden. Als Fluoreszenzmaß diente dabei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), die mit der Software *Cell Quest* erstellt werden konnte. Für die Auswertung wurden nur die Fluoreszenzdaten oberhalb der Eigenfluoreszenz des jeweiligen Zelltyps berücksichtigt, deren Bestimmung mittels einer ungefärbten Probe erfolgte (Daten nicht gezeigt). Abbildung 19 zeigt die graphische Auftragung der MFI-Werte in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden. Durch Interpolation der Datenmesspunkte wurden die jeweiligen Exponentialfunktionen mit *Excel* ermittelt (Abbildung 19, unten links), die für alle untersuchten Zelltypen eine ähnliche Abnahme der Fluoreszenz zeigen. Die Exponenten dieser Funktionen, die der Konstante  $k$  entsprechen, konnten zur Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeiten  $v_p$  in die folgende Gleichung eingesetzt werden:

$$v_p = -\frac{1}{k} \cdot \ln\left(\frac{1}{2}\right)$$

**$v_p$ := Proliferationsgeschwindigkeit;  $k$ := Exponent der Funktionswerte  $f(y)$  aus Abbildung 19**



**Abbildung 19: Proliferationsassay von DT40Cre1, Ubc13<sup>+/-</sup> Klon 1 und 2 und Ubc13<sup>+/-R</sup> Klon 1 und 2**

Die Fluoreszenz ist in Abhängigkeit der Zeit in Form einer Exponentialfunktion dargestellt. Die zugehörigen Gleichungen sind unten links abgebildet. Es werden DT40Cre1, Ubc13<sup>+/-</sup> Klon 1 und 2 sowie Ubc13<sup>+/-R</sup> Klon 1 und 2 miteinander verglichen.

Tabelle 1 zeigt alle berechneten Proliferationsgeschwindigkeiten in der Übersicht. Es ist kein nennenswerter Unterschied zwischen den einzelnen Zelltypen zu erkennen, was zeigt, dass die Unterschiede in der Ig-GC Aktivität nicht auf Proliferationsunterschiede zurückzuführen sind, sondern der Ig-GC Mechanismus durch die Proteinmenge an Ubc13 reguliert wird.

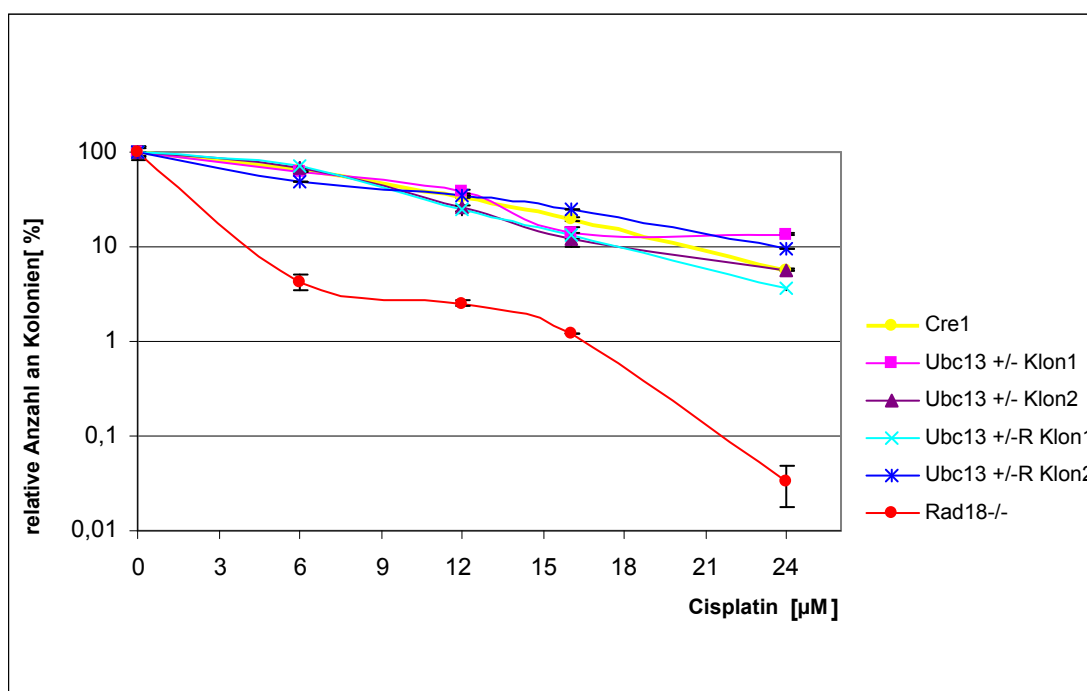
**Tabelle 1: Übersicht über die berechneten Proliferationsgeschwindigkeiten**

Zelltyp	Cre1	Ubc13 <sup>+/-</sup> Klon1	Ubc13 <sup>+/-</sup> Klon2	Ubc13 <sup>+/-R</sup> Klon1	Ubc13 <sup>+/-R</sup> Klon2
<b>Proliferationsgeschwindigkeit</b>	11,6 h	11,0 h	10,8 h	11,0 h	11,0 h

Zudem wurde untersucht, ob die Ubc13-Dosis das Überleben der Zelltypen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien beeinflusst. Aufgrund von Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe wurde dazu der Methylzellulose-Überlebensassay (*methylcellulose survival assay*: MCSA) mit der Droge Cisplatin, der für Zellen mit defekter HR-Aktivität einen Überlebensnachteil aufzeigen kann, durchgeführt (Protokoll abgeändert nach Buerstedde und Takeda, 2006). Hierfür wurden erneut die Zelltypen des Zellsets<sup>Ig-GC</sup> sowie DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen als Kontrolle zur Wirkung von Cisplatin eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin für zwei Stunden

behandelt, um dann auf Methylzellulose ausplattiert zu werden. Um diese Ergebnisse statistisch besser auswerten zu können, geschah dieser Ansatz in drei verschiedenen Verdünnungsstufen pro Zelltyp und wurde jeweils doppelt angesetzt. Nach einer Woche wurden die entstandenen Kolonien pro Well ausgezählt und nach Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungsstufe als absolute Zellzahlen miteinander verglichen.

Bei der Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit von der Cisplatin-Konzentration sieht man wie erwartet einen deutlichen Phänotyp bei  $\text{Rad18}^{-/-}$ -Zellen. Alle anderen Zelltypen verhalten sich gegenüber einer Cisplatinbehandlung ähnlich sensibel (Abbildung 20). Damit scheinen die beiden Heterozygoten Zelllinien,  $\text{Ubc13}^{+/-}$  Klon 1 und 2, keine Beeinträchtigung der HR-Rate zu haben, die die Schadenstoleranz der Zellen substantiell beeinflusst. Dass sich die heterozygoten Zellen aber, wie zuvor gezeigt, durchaus in ihrer Aktivität für die Ig-GC unterscheiden, könnte darin begründet sein, dass ein GC-spezifischer Prozess betroffen ist, oder aber die Ig-GC sensibler als die HR gegenüber verschiedenen  $\text{Ubc13}$ -Level reagiert. Auch ein erhöhter Anteil an  $\text{Ubc13}$ , wie bei  $\text{Ubc13}^{+/-R}$  Klon 2 scheint die Reparaturkapazität der Zellen nicht zu verändern. Dies könnte evtl. durch andere regulatorische Proteine, welche die Funktionsweise von  $\text{Ubc13}$  gegenregulieren können, wie z.B. deubiquitinierende Proteine, bedingt sein.



**Abbildung 20: MCSA-Methylzelluloseassay**

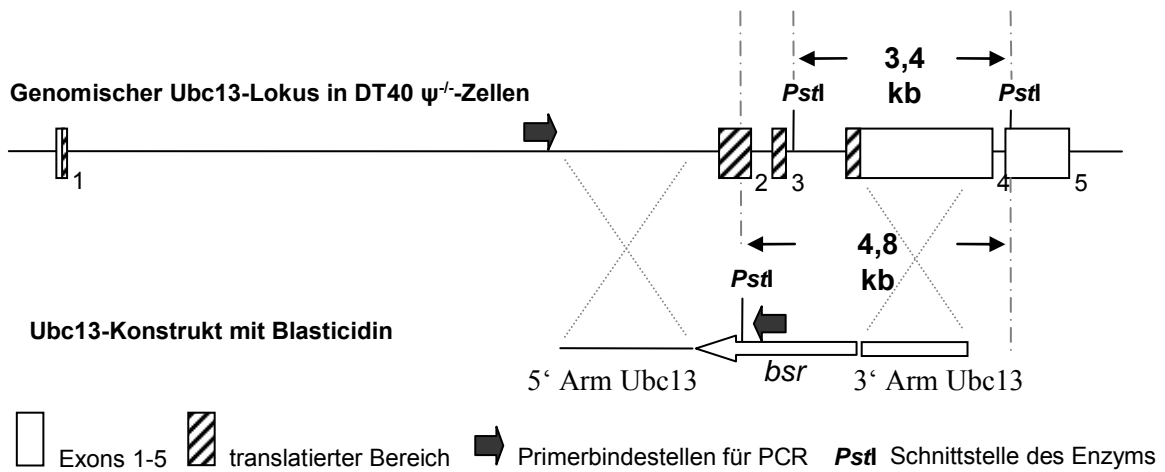
MCSA-Methylzelluloseassay nach Cisplatinbehandlung von DT40Cre1,  $\text{Ubc13}^{+/-}$  Klon 1 und 2,  $\text{Ubc13}^{+/-R}$  Klon 1 und 2 und  $\text{Rad18}^{-/-}$ -Zellen. Die relative Anzahl an überlebenden Kolonien ist gegen die jeweilige Cisplatinkonzentration aufgetragen.

#### 4.3.4 Inaktivierung eines Ubc13-Allels in DT40 $\Psi^-$ AID<sup>R</sup>-Zellen

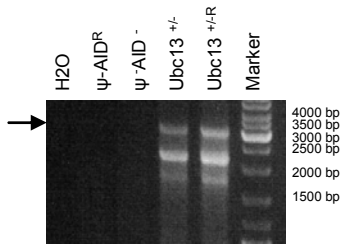
Damit DT40-Zellen trotz einer Störung der Ig-Genkonversion AID-generierte Schäden reparieren können, wechseln Hühner B-Zellen in einem solchen Fall oft zur SHM. Die Sequenzdaten aus Abbildung 18 geben keine ersten Hinweise darauf, dass Ubc13<sup>+/-</sup>-Klone eine erhöhte Rate an SHM besitzen, was sich durch gehäuft auftretende Punktmutationen nachweisen ließe. Dies könnte aber dadurch bedingt sein, dass DT40-Zellen im Cre1-Hintergrund generell sehr wenig SHM durchführen, so dass auch ein gesteigerter Anteil immer noch zu gering ist, um in den von uns durchgeführten Sequenzanalysen detektiert zu werden. Doch existiert eine weitere DT40-Zelllinie, die sich besser zur Untersuchung der SHM eignet, da sie AID überexprimiert, aber gleichzeitig über keine Pseudogene mehr verfügt, so dass diese Zellen keine Ig-Genkonversion mehr durchführen können (Arakawa et al., 2002). Diese ist im Vorfeld von einer anderen Arbeitsgruppe generiert worden, indem AID zunächst komplett in DT40Cre1 deletiert (AID<sup>-/-</sup>) und durch eine AID-IRES-GFP-Kassette wieder rekonstituiert (AID<sup>R</sup>) wurde. Anschließend ist durch den *knockout* aller Pseudogene der Zelltyp DT40 $\Psi^-$ AID<sup>R</sup> hergestellt worden (Arakawa et al., 2002).

Um den Einfluss von Ubc13 auf die SHM zu untersuchen, wurden daher Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen im genetischen  $\Psi^-$ AID<sup>R</sup>-Hintergrund generiert. Dabei wurde wie bei der Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in Cre1-Zellen vorgegangen (siehe Abschnitt 4.3.1). Da die Puromycin-Resistenz durch die im Vorfeld integrierte AID-Kassette schon verwendet wird, wurde ein Ubc13-*targeting* Vektor mit einer Blasticidin-Resistenz kloniert. Zwei voneinander unabhängige Transfektionen zur gerichteten Integration des *targeting*-Vektors ergaben zwar insgesamt 65 EZK, jedoch konnte nur einer davon anhand eines 3200 bp großen PCR-Produktes als  $\Psi^-$ AID<sup>R</sup>Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon bestätigt werden (Abbildung 21, rote Pfeile). Über die Ursache dieser geringen *targeting*-Effizienz kann momentan nur spekuliert werden. Genau wie zuvor im genetischen Cre1-Hintergrund wurde auch im  $\Psi^-$ AID<sup>R</sup>Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon durch Einführung eines cDNA-Überexpressionsvektors Ubc13 wieder rekonstituiert ( $\Psi^-$ Ubc13<sup>+/-R</sup>) und per PCR überprüft (Abbildung 21C). Die so generierten Zelltypen sowie die zugehörigen, parental Zelllinien  $\Psi^-$ AID<sup>R</sup> und  $\Psi^-$ AID<sup>-/-</sup> ergaben zusammen das experimentelle Zellset<sup>SHM</sup> und wurden mittels Southern Blot und Western Blot untersucht.

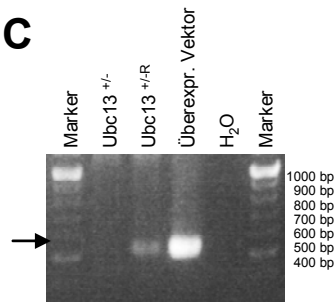
**A**



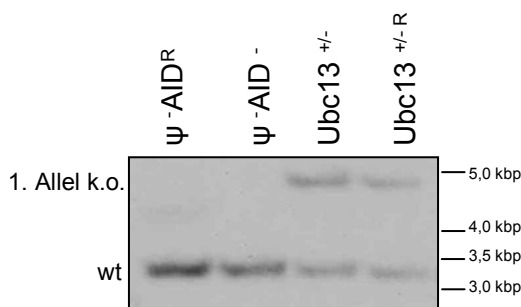
**B**



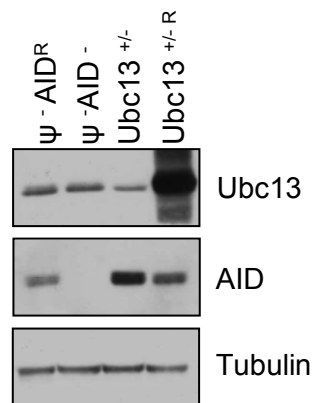
**C**



**D**



**E**



**Abbildung 21: Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in DT40 $\psi^-$ AID<sup>R</sup>-Zellen**

A) Schematische Darstellung des endogenen Ubc13-Lokus in DT40 $\psi^-$ AID<sup>R</sup>-Zellen und des verwendeten Ubc13 *targeting* Vektors; B) Nachweis der gerichteten Integration in das erste Ubc13-Allel durch ein 3200 bp großes PCR-Produkt (durch Pfeil markiert); C) Nachweis des Ubc13-Überexpressionsvektors durch PCR anhand eines 550 bp großen Produktes; D) Überprüfung der generierten Zelltypen durch Southern Blot Analyse; E) Überprüfung der Ubc13-Expressionslevel in den generierten Zelltypen durch Western Blot Analyse. Inkubationen der Membran mit einem Antikörper gegen Ubc13, AID und der Ladekontrolle Tubulin sind dargestellt.

Bei gerichteter Integration des Konstruktes in das erste Allel entstand nach *PstI*-Spaltung ein Produkt von knapp 4,8 kbp. Das Produkt der gleichen Spaltung im wt-Allel ist hingegen nur 3,4 kbp groß, so dass sich diese beiden Fragmente deutlich für die einzelnen Zelltypen voneinander unterscheiden lassen und den heterozygoten Klon als solchen bestätigen können (Abbildung 21D). Die Western Blot Analyse in Abbildung 21E kann zudem die verringerte Expression von Ubc13 im Klon  $\Psi$ Ubc13<sup>+/-</sup> auf Proteinebene sowie die Rekonstitution im Klon  $\Psi$ Ubc13<sup>+/-R</sup> bestätigen. Zudem wurden die Zelltypen mittels Western Blot auf die Menge des exprimierten AID-Proteins hin untersucht. AID ist wie erwartet im  $\Psi$ AID<sup>R</sup>-Hintergrund bedeutend höher exprimiert als im Cre1-Hintergrund, so dass man das Protein gut detektieren kann. Eigentlich sollte die Menge des exprimierten transgenen AID-Proteins für alle EZK, die in diesem genetischen Hintergrund generiert worden sind, miteinander vergleichbar sein, jedoch sind die AID-Proteinlevel leicht unterschiedlich (Abbildung 21E, AID-Inkubation). Dies muss bei Aussagen zu potentiellen Unterschieden der SHM-Aktivität berücksichtigt werden.

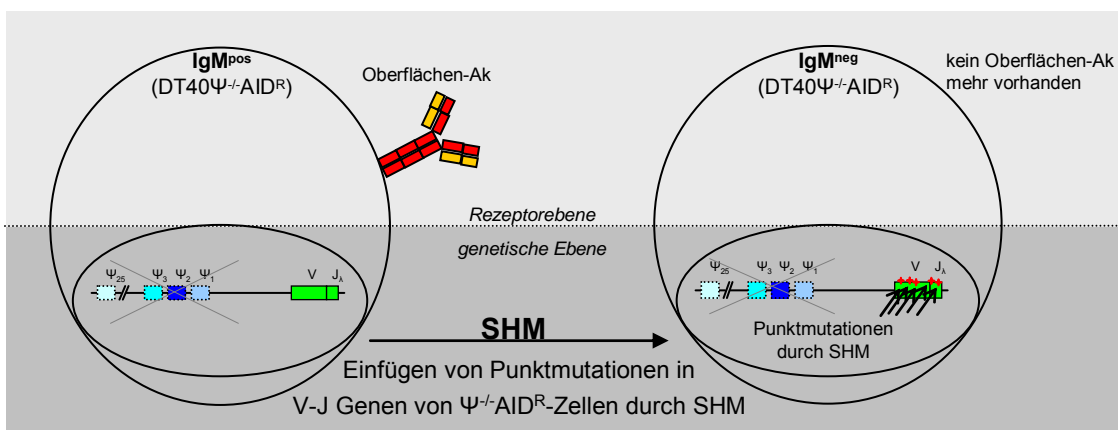
#### 4.3.5 Einfluss von Ubc13 auf die somatische Hypermutation

Der somatische Hypermutationsassay in DT40  $\Psi$ AID<sup>R</sup>-Zellen beruht auf der Entstehung von IgM<sup>neg</sup>-Zellen aus anfangs IgM<sup>pos</sup>-Zellen, wobei auf genomischer Ebene Punktmutationen in der leichten Kette der IgM-Ak eingeführt werden. Bei zu vielen bzw. *nonsense* Mutationen kann dies zur Folge haben, dass der Antikörper nicht mehr auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden kann (IgM<sup>neg</sup>-Zellen, siehe Abbildung 22A).

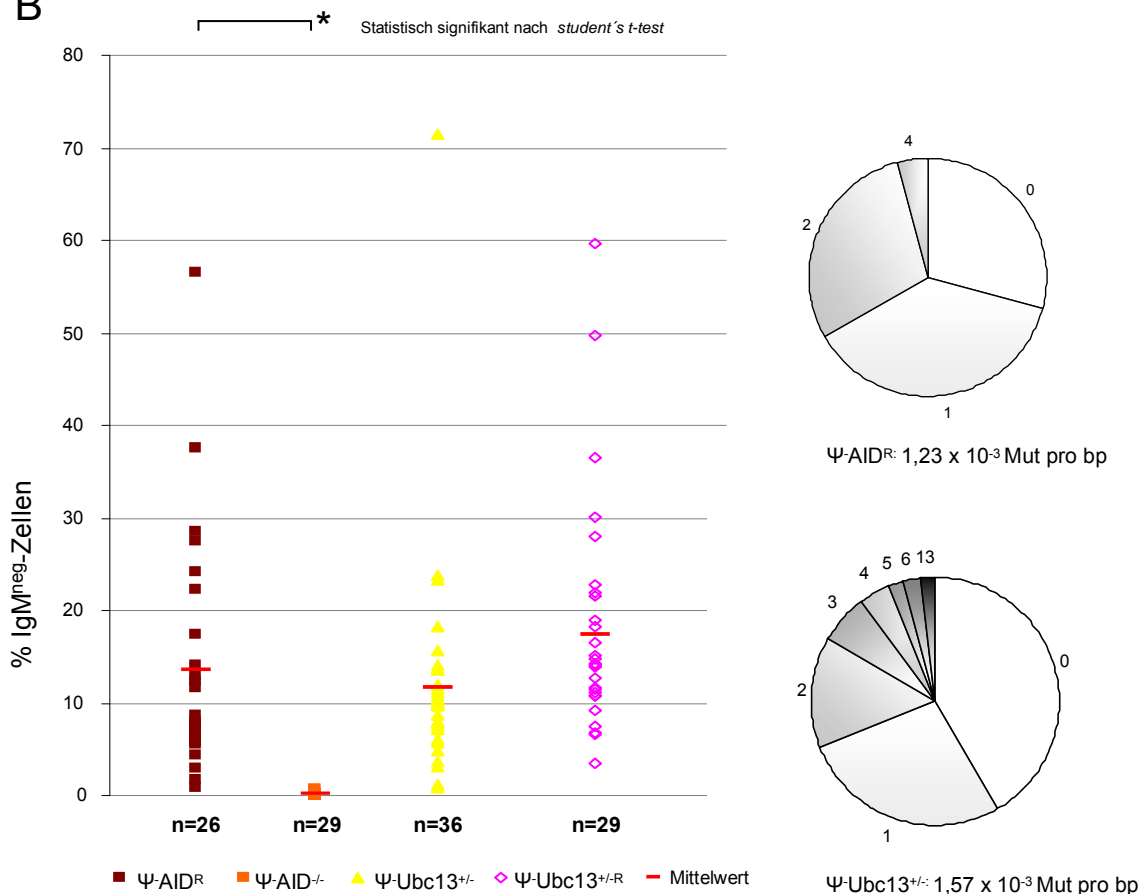
Analog zum Ig-Genkonversionsassay (siehe Abschnitt 4.3.2) kann der Prozess auf der Oberfläche der Hühner-B-Zellen durch Färbung mit einem anti-IgM<sub>PE</sub>-Ak und einer anschließenden FACS-Analyse sichtbar gemacht werden.

Diese zeigt nach zweiwöchiger Kultivierung der anfangs IgM<sup>pos</sup>-Zellen bei allen Zelltypen bis auf DT40 $\Psi$ AID<sup>-</sup> eine Population von 10-20 % IgM<sup>neg</sup>-Zellen (Abbildung 22B). Nur bei statistischer Analyse der parental Zellelinie  $\Psi$ AID<sup>R</sup> versus  $\Psi$ AID<sup>-</sup>-Zellen mit Hilfe eines *student's t-test* konnte ein statistisch hoch signifikanter Unterschied in der SHM-Rate festgestellt werden ( $p < 0,003$ ). Der Anteil an SHM scheint weder durch eine Verringerung des Ubc13-Levels, noch durch eine Überexpression von Ubc13 beeinflusst zu werden.

A



B



**Abbildung 22: Somatischer Hypermutationsassay mit verschiedenen DT40-Zellen**

A) Schema der SHM in DT40Ψ<sup>-</sup>AID<sup>R</sup>-Zellen; B) Übersicht aller FACS-Daten aus dem SHM-Assay von DT40Ψ<sup>-</sup>AID<sup>R</sup>, Ψ<sup>-</sup>AID<sup>-</sup>, Ψ<sup>-</sup>Ubc13<sup>+/-</sup> und Ψ<sup>-</sup>Ubc13<sup>+/-</sup>R Zellen mit Mittelwert und statistischer Auswertung; C) Mutationsanalyse von je 48 Subklonen des Zelltypes Ψ<sup>-</sup>AID<sup>R</sup> sowie Ψ<sup>-</sup>Ubc13<sup>+/-</sup>.

Um die FACS-Daten des SHM-Assays mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden Sequenzanalysen der beteiligten Zelltypen nach sechswöchiger Kultivierung analog zur Sequenzanalyse im Cre1-Hintergrund durchgeführt. Insgesamt wurden je 48 Sequenzen verschiedener Subklone der Zelltypen  $\Psi^{-}AID^R$ ,  $\Psi^{-}AID^R Ubc13^{+/-}$  sowie  $\Psi^{-}AID^{-}$  miteinander verglichen. Die Anzahl der Mutationen wurden in jeweils 48 sequenzierten Subklonen ausgezählt und ist für den parentalen sowie heterozygoten Zelltyp als Diagramm in Abbildung 22C zusammengefasst. In beiden untersuchten Zelllinien können überwiegend Subklone mit keiner oder nur einer einzelnen Punktmutation nachgewiesen werden. Subklone des heterozygoten Zelltyps  $\Psi^{-}AID^R Ubc13^{+/-}$  ( $1,57 \times 10^{-3}$  Mutationen pro bp) weisen im direkten Vergleich mit der parentalen Zelllinie  $\Psi^{-}AID^R$  ( $1,23 \times 10^{-3}$  Mutationen pro bp) insgesamt zwar etwas mehr Punktmutationen auf, doch ist dies vor allem auf einen einzelnen Subklon zurückzuführen, in dem 13 Mutationen nachgewiesen werden konnten. Dies spiegelt sich auch in der statistischen Auswertung wieder, die keinen signifikanten Unterschied in der Rate an SHM aufzeigt, so dass die Ubc13-Dosis auch im Zellset<sup>SHM</sup> keinen Einfluss auf die SHM hat ( $p > 0,05$ , Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.6 Beeinflussung der gerichteten Integration durch Ubc13-Level

Die Tatsache, dass die Ubc13-Dosis nur den Ig-Umlagerungsprozess durch die Ig-Genkonversion, nicht aber die SHM reguliert, hat uns zunächst überrascht. Beide Prozesse leiten sich von Läsionen ab, die durch AID eingeführt werden und durch weitere Enzyme zu abasischen Stellen sowie SSB prozessiert und anschließend über TLS oder HR repariert werden. Da aber in den von uns durchgeführten Experimenten mit heterozygoten Ubc13-Klonen keine Verschiebung der Reparatur in Richtung TLS festzustellen war, muss die Reparatur der durch AID generierten Läsionen auf anderem Weg erfolgen. Da jüngst gezeigt werden konnte, dass die Ig-GC von DSB initiiert werden kann (Tang und Martin, 2006), könnte auch in unserem Fall die DSB-Reparatur in Form von NHEJ oder HR AID-generierte Läsionen auf eine eher fehlerfreie Art und Weise beheben. Beide Prozesse konkurrieren miteinander, so dass die Möglichkeit besteht, dass ein Defekt des einen Prozesses zu einer Erhöhung des anderen führt. Bezogen auf den Ig-Lokus würde dies bedeuten, dass die Verminderung der Ig-Genkonversion, die eine bestimmte Form der HR darstellt, den Reparaturweg über NHEJ hochregulieren könnte, der im Vergleich zur SHM als relativ akkurat beschrieben ist (siehe Einleitung). Damit würde die Reparatur der durch AID verursachten Läsionen nicht mehr über die an der SHM beteiligten



Translasiionspolymerasen erfolgen, so dass keine zusätzlichen Punktmutationen im Ig-Lokus nachzuweisen wären.

Diese These wollten wir durch ein Experiment überprüfen, in dem die *targeting*-Rate in parentalen sowie heterozygoten EZK, die mit demselben *targeting*-Vektor transfiziert werden, bestimmt wird. Jedes gerichtete *targeting-event* entspricht dabei einem HR-Ereignis, wo hingegen jedem ungerichteten *targeting-event* die Reparatur durch NHEJ zugewiesen werden kann. Dazu wurden DT40Cre1 sowie Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen mit einem Rad18-*targeting*-Vektor transfiziert. Eine gerichtete Integration ließ sich anhand eines 2,7 kbp großen PCR-Produktes mittels PCR nachweisen (nicht dargestellt).

Es wurden insgesamt 45 EZK pro Zelltyp auf gerichtete Integration hin untersucht. Dabei ergab sich nach Auswertung aller EZK ein Anteil von 40 % für die parentale Zelllinie Cre1, wohingegen der Anteil an gerichteter Integration für beide heterozygoten Klone, mit 11% für Klon 1 und 7 % für Klon 2, stark vermindert war (siehe Tabelle 2). Damit steigt der Anteil der NHEJ von ca. 60 % für Cre1-Zellen auf 80-90 % in den beiden heterozygoten Klonen. Dies bestätigt unsere Hypothese, dass die durch AID-generierten Läsionen durch einen relativ akuraten Reparaturweg über NHEJ repariert werden können, so dass, wie durch die DNA-Sequenzdaten bereits gezeigt werden konnte, keine zusätzlichen Mutationen in im Genom nachzuweisen sind.

**Tabelle 2: Targeting-Rate des Rad18-Vektors in DT40Cre1 sowie Ubc13<sup>+/-</sup> Klon 1 und Klon 2**

Zelltyp	Anzahl EZK	<i>targeting-events</i>	<i>targeting</i> -Rate
<b>DT40Cre1</b>	45	18	40 %
<b>Ubc13<sup>+/-</sup> Klon 1</b>	45	5	11 %
<b>Ubc13<sup>+/-</sup> Klon 2</b>	45	3	7 %

## 5 Diskussion

Der Rad6-Weg kontrolliert in replizierenden Hefen die Ubiquitinierung von PCNA und bestimmt dadurch, ob die Überbrückung von Läsionen über Mutagenese oder Rekombination verläuft (Hoeye et al., 2002; Jentsch et al., 1987). Zu Beginn dieser Doktorarbeit war die Regulation und Bedeutung der Monoubiquitinierung von PCNA weitestgehend schon in Vertebraten aufgeklärt, die Polyubiquitinierung hingegen noch relativ unerforscht. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der durch den Rad6-Weg gesteuerte PCNA-Ubiquitinierungsprozess in verschiedenen Vertebratenzelllinien genauer untersucht, sowie Experimente zu potentiellen Regulationsmechanismen der PCNA-Ubiquitinierung und Beeinflussung des beteiligten E2-Enzyms, Ubc13, durchgeführt. Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich jedoch mit der funktionellen Analyse von Ubc13 bei Ig-Diversifizierungsprozessen in DT40-Zellen.

### 5.1 Analyse der PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten

---

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurde die Ubiquitinierung von PCNA in Vertebraten genauer untersucht. Dazu wurde ein Ubiquitinierungsassay etabliert mit dem sich die Ubiquitinierung an der Plattform PCNA nach DNA-Schädigung durch Western Blot Analyse mit Hilfe eines anti-PCNA Ak verfolgen lässt.

Der Assay wurde zunächst in HEK-293 Zellen etabliert. Durch UV-Behandlung dieser Zellen konnten mehrere PCNA-Banden unterschiedlichen Molekulargewichtes induziert werden. Die Bande bei knapp 40 kDa ließ sich aufgrund der Beschreibungen in der Literatur monoubiquitiniertem PCNA zuordnen (Hoeye et al., 2002; Kannouche et al., 2004). Die biologische Relevanz von monoubiquitiniertem PCNA konnte bereits durch mehrere Studien in Hefen sowie Säugetieren geklärt werden. Dabei zeigte sich, dass durch DNA-Schädigung verursachte PCNA-Monoubiquitinierung die Affinität spezieller TLS-Polymerasen zu PCNA verbessert, und im Zuge dessen die Aktivität der TLS gesteigert werden kann (Bi et al., 2006; Kannouche und Lehmann, 2004; Stelter und Ulrich, 2003). Dies ist auf Ubiquitin-bindende Domänen von TLS-Polymerasen der Y-Familie, wie z.B. die Polymerasen  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  und Rev1, zurückzuführen (Bienko et al., 2005; Guo et al., 2006; Plosky et al., 2006). Je nach Art der DNA-Läsionen wird eine bestimmte Polymerase aktiviert. So konnte bei der Reparatur von UV-induzierten Pyrimidindimeren in der DNA eine Beteiligung von Pol  $\eta$  ermittelt werden (Johnson et al., 1999; Masutani et al., 1999),

während Benzopyrene und abasische Stellen vorwiegend über Pol  $\kappa$  repariert werden (Rechkoblit et al., 2002; Suzuki et al., 2002).

Da die Polyubiquitinierung bis zu diesem Zeitpunkt nur in Hefen, nicht aber in höheren Eukaryoten detektiert werden konnte, wurde vermutet, dass entweder die Rate an Polyubiquitinierung insgesamt in höheren Organismen geringer ist oder höhere Spezies einen erheblich größeren Abbau von Polyubiquitinketten betreiben (Kannouche et al., 2004). Zudem wurde spekuliert, dass es in Vertebraten evtl. einer stärkeren DNA-Schädigung bedarf um den fehlerfreien Pfad des Rad6-Weges in gleicher Weise zu aktivieren wie in Hefen. Daher lagen in den von uns durchgeführten PCNA-Ubiquitinierungsassays die UV-Stärken von 20 J/m<sup>2</sup> bis 1000 J/m<sup>2</sup> zum größten Teil deutlich über der bisher in der Literatur beschriebenen Maximaldosis von 200 J/m<sup>2</sup> (Stelter und Ulrich, 2003).

Dadurch ist es uns tatsächlich gelungen eine distinkte, höhermolekulare PCNA-Bande bei 100 kDa durch UV-Behandlung zu induzieren, doch konnten wir zu diesem Zeitpunkt und ohne weitere Untersuchungen diese Bande noch nicht genau einordnen. Die Tatsache, dass dabei keine PCNA-Leiter mit PCNA-Modifikationen unterschiedlichen Molekulargewichts entstanden ist, widerspricht dem gängigen Modell des Ubiquitinierungsprozesses, bei dem jedes Ubiquitin einer Polyubiquitinkette einzeln und kovalent mit dem Substrat bzw. Ubiquitin verbunden wird (Pickart, 2000; Pickart und Eddins, 2004). Dies sprach erst einmal gegen eine Einordnung der höhermolekularen Bande als Polyubiquitinbande.

### 5.1.1 PCNA-Ubiquitinierung in DT40-Zellen

Da uns vor allem interessiert hat, wie B-Zellen die Ubiquitinierung von PCNA regulieren, wurde die Hühner-B-Zelllinie DT40 nach UV-Bestrahlung mit dem zuvor etablierten Assay untersucht. Die durch UV induzierte PCNA-Ubiquitinierung war vor allem bezogen auf Monoubiquitinierung nicht so stark ausgeprägt wie bei HEK-293 Zellen. In der Literatur ist bereits beschrieben worden, dass sich verschiedene Spezies durchaus in ihrer Aktivität für PCNA-Ubiquitinierung unterscheiden können, so dass es nicht verwunderlich ist, dass sich bei Vergleich von DT40 und HEK-293 Zellen trotz derselben eingesetzten UV-Mengen unterschiedliche PCNA-Modifikationen ergaben (Frampton et al., 2006; Hofmann und Pickart, 1999; Leach und Michael, 2005).

Steigende Konzentrationen an MMS konnten auch in DT40-Zellen die PCNA-Monoubiquitinbanden deutlich verstärken. Daneben ließen sich durch die MMS-

Behandlung auch zwei schwache Banden höheren Molekulargewichts nachweisen, eine bei 72 und eine bei 100 kDa, deren Identität durch Zusatzexperimente geklärt werden sollte. Nach HU-Behandlung war hingegen keine verstärkte PCNA-Ubiquitinierung nachweisbar. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass die Wirkungsweise von HU, anders als UV oder MMS darauf beruht, die DNA-Synthese an sich zu unterbinden (Finazzi et al. 2001). Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass aufgrund des bereits hohen Levels an PCNA-Monoubiquitinierung eine Steigerung der Monoubiquitinierung nicht mehr nachweisbar ist. Diese Monoubiquitinbanden sind wahrscheinlich auf spontane Schäden während der Replikation oder allgemeine Zellkulturbedingungen, wie z.B. oxidativen Stress zurückzuführen, die trotz fachgerechter Behandlung der Zellen in mehreren, unabhängigen Experimenten im unbehandelten Zustand detektiert werden konnten.

Die von uns durchgeführten Ubiquitinierungsassays haben gezeigt, dass sich die Aktivitäten der PCNA-Ubiquitinierung je nach Zelllinie und Droge stark unterscheiden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die verwendeten Drogen verschiedene DNA-Reparaturwege einleiten können, die die Läsion mit einer unterschiedlichen Genauigkeit und Prozessivität reparieren. So weiß man, dass Schäden die durch alkylierende Agenzien verursacht werden, hauptsächlich über BER prozessiert werden (Fortini et al., 2003), während UV-Schäden vorwiegend durch NER repariert werden (Costa et al., 2003). Je nach Aktivität dieser Wege in den geschädigten Zellen, ist demnach der PRR-Weg nicht immer mit derselben Dringlichkeit erforderlich um die Zellen vor Apoptose zu schützen.

### 5.1.2 Rad18-abhängige PCNA-Monoubiquitinierung

Um die potentielle Rolle des Rad6-Weges bei der SHM zu untersuchen, waren in unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld DT40Rad18<sup>-/-</sup> Zellen generiert worden. Diese Zellen zeigten tatsächlich weniger SHM, womit wir erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen dem Rad6-Weg und der SHM aufzeigen konnten (Bachl et al., 2006). Mit Ubiquitinierungsassays war wichtig zu klären, ob dies auf eine konservierte Rolle von Rad18 bei der Regulation der PCNA-Monoubiquitinierung in Vertebraten zurückzuführen ist.

Der Assay wurde, wie zuvor in der parentalen DT40-Zelllinie Cre1 etabliert, auch für DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen mit dem Agenz MMS durchgeführt. Die klare Induktion von monoubiquitiniertem PCNA in DT40Cre1, im Gegensatz zur kaum nachweisbaren Monoubiquitinierung in Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen nach MMS-Behandlung, macht deutlich, dass

Rad18 auch in Vertebraten die Rolle als Ubiquitinligase des Rad6-Weges beibehalten hat. Doch war erstaunlicherweise in DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen noch ein Restanteil an monoubiquitiniertem PCNA detektierbar. Daraus konnte gefolgert werden, dass Rad18 zwar die Hauptubiquitinligase für PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten zu sein scheint, dass es aber daneben noch eine weitere Ubiquitinligase geben muss, die die Funktion von Rad18 bei Bedarf übernehmen kann (Bachl et al., 2006).

In Anbetracht der Schlüsselfunktion von Rad18 bei der PRR und der größeren Anzahl an spezialisierten TLS-Polymerasen in Vertebraten ließe sich vielleicht erklären, warum in höheren Spezies eine komplexere Regulation erforderlich ist, bei der Rad18 nicht die selbe exzeptionelle Rolle wie in Hefen spielen kann (Goodman und Tippin, 2000). Zudem könnte die für Vertebraten spezifische Interaktion des Rad6-Weges mit einem weiteren DNA-Stressreparaturweg, der über FANC-Proteine gesteuert wird, eine vielschichtigere Regulation in Vertebraten als in Hefen erfordern (Bergink und Jentsch, 2009; Zhang et al., 2008a). Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte in der Zwischenzeit bestätigen, dass Rad18 zwar die dominante E3-Ligase für PCNA-Ubiquitinierung in DT40-Zellen ist, dass es aber neben dieser auch eine von Rad18 unabhängige Form der Ubiquitinierung gibt (Simpson et al., 2006).

Erst kürzlich konnten zwei weitere E3-Ligasen, RNF8 und RNF168 identifiziert werden, die zusammen mit Ubc13 K63-verknüpfte Polyubiquitinketten auf Chromatin übertragen, und so einen weiteren DNA-Reparaturweg über Ubiquitinierung aktivieren können (Doil et al., 2009; Kolas et al., 2007; Shao et al., 2009; Wang und Elledge, 2007). Zudem konnte jüngst eine Relevanz von RNF8 bei der Monoubiquitinierung von PCNA sowie bei der Rekrutierung von Rad18 zum geschädigten Chromatin und damit eine funktionelle Verbindung von Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur gezeigt werden (Huang et al., 2009; Zhang et al., 2008b). Für diese neu entdeckten E3-Ligasen gibt es sogar eine klinische Relevanz, da Patienten mit einem Defekt für RNF168 (*RIDDLE-Syndrom*), eine fehlerhafte CSR aufweisen, so dass diese E3-Ligase eine große Bedeutung bei der Diversifizierung des Immunsystems zu haben scheint (Doil et al., 2009; Stewart et al., 2009). Daher sind Regulationswege der Ubiquitinierung in Zusammenhang mit dem Rad6-Weg auch in Zukunft von besonderem Interesse.

### 5.1.3 Untersuchungen höhermolekularer PCNA-Modifikationen

IP-Experimente sollten dabei helfen, höhermolekulare PCNA-Modifikationen genauer zu klassifizieren. Durch die Detektion der durch Ko-Immunopräzipitation aufgereinigten Komplexe mit einem anti-Ubiquitin Ak ist es uns gelungen, die Bande auf Höhe von 72 kDa als Protein zu bestätigen, das unter anderem Ubiquitinmoleküle enthält. Doch konnte die Bande keiner eindeutigen Modifikation von PCNA zugeordnet werden, da zum einen eine starke Bande in der unbehandelten IP-Probe gezeigt werden konnte, so dass unklar ist, ob die höhermolekulare Bande tatsächlich erst durch UV-Behandlung induziert worden und damit einer Aktivierung des Rad6-Weges zugeordnet werden kann. Zum anderen war nicht ersichtlich, warum nur nach Behandlung mit UV die Polyubiquitinbande als aufgereinigter Komplex bestätigt werden konnte, dies aber nach Behandlung mit MMS ausblieb, obwohl in den zuvor durchgeführten Ubiquitinierungsassays mit diesem Agens eine gute Induktion höhermolekularer Banden erreicht worden war. Auch konnten wir uns nicht erklären, warum die Monoubiquitinbande bei einer Ko-IP nach MMS nicht nachweisbar war, obwohl zuvor auch für diese Form der PCNA-Modifikation eine starke Induktion detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Durch eine neu generierte DT40-Zelllinie einer anderen Arbeitsgruppe bot sich eine einfache Möglichkeit, PCNA-Ubiquitinierung an K164 als solche mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu identifizieren. Diese Zelllinie ist dadurch charakterisiert, dass sie am Lysin-K164 von PCNA eine Punktmutation aufweist, und daher an dieser Stelle nicht mehr ubiquitiniert werden kann (Arakawa et al., 2006). DT40<sup>K164R</sup>-Zellen wurden zusammen mit DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen, die in den zuvor durchgeführten Experimenten eine erhebliche Reduktion der Monoubiquitinierung zeigten, und den jeweiligen parental Zelllinien in einem Ubiquitinierungsassay mit MMS eingesetzt. Bei der Detektion der PCNA-Banden ergab sich, wie zuvor angenommen, nur für die beiden parental Zelllinien eine Induktion der PCNA-Monoubiquitinierung. Damit kann diese Art der PCNA-Modifikation eindeutig als Monoubiquitinierung am Lysin K164 von PCNA, die durch den Rad6-Weg reguliert wird, bestätigt werden. Die Tatsache, dass diese Bande nicht in DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen zu detektieren ist, ist wahrscheinlich dem Detektionslimit des verwendeten PCNA-Ak zuzuschreiben.

In Bezug auf die höhermolekularen Banden ergab sich jedoch ein überraschendes Bild, da diese bei allen vier getesteten Zelllinien auftraten und zudem bei DT40<sup>K164R</sup>-Zellen, der Negativkontrolle für Mono-, und Polyubiquitinierung, am stärksten ausgeprägt waren. Da bisher außer dem Lysin K164 keine weitere Ubiquitinierungsstelle am PCNA von

Vertebraten beschrieben worden ist (Hoege et al., 2002), bedeutet dies, dass es sich bei den höhermolekularen Banden, die bei den meisten von uns durchgeführten Ubiquitinierungsassays induziert worden sind, nicht um PCNA-Polyubiquitinierungsbanden am Lysin K164 handeln kann.

Somit können nach dem derzeitigen Stand der Literatur, und mit den von uns durchgeführten Assays nur Aussagen zur Monoubiquitinierung gemacht werden. Es kann aber dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Substrat des Rad6-Weges noch an einem weiteren Lysin ubiquitiniert wird. In Hefen gibt es daneben z.B. das Lysin K127, welches ubiquitiniert und SUMOyliert werden kann, welches aber in Vertebraten nicht modifiziert wird (Ulrich, 2005; Watts, 2006).

Auch gibt es einen Hinweis aus der Literatur, mit dem sich höhermolekulare Banden von ca. 90 kDa als PCNA-Trimere einordnen lassen könnten, bei denen die drei PCNA-Monomere kovalent miteinander verknüpft worden sind und sich daher durch denaturierende Konditionen wie bei einer SDS-Gel Elektrophorese nicht voneinander trennen lassen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Verknüpfung nicht nur durch quervernetzende Drogen, sondern auch durch die Behandlung mit anderen Agenzien zusammen mit sichtbarem Licht induziert werden kann, was bedeutet, dass diese PCNA-Trimere auch bei den von uns durchgeführten Ubiquitinierungsassays mit verschiedenen Agenzien entstanden sein könnten (Bae et al., 2008). Zur eindeutigen Zuordnung der von uns detektierten Banden als PCNA-Trimere müssten diese aber noch durch eine andere Methode, wie z.B. Massenspektroskopie, bestätigt werden.

---

## 5.2 Potentielle Regulationswege von PCNA-Ubiquitinierung und Ubc13 in Vertebraten

---

Es wurde lange Zeit vermutet, dass Zellen mit hoher Rate an SHM wahrscheinlich die fehlerhafte Reparatur der fehlerfreien vorziehen um möglichst viele Mutationen im Ig-Locus zu induzieren. Daher wurde über eine Beteiligung des Rad6-Weges bei der Regulation der SHM spekuliert. Diese Vermutung konnten wir jüngst bestätigen, indem wir die Regulation der SHM durch Rad18, ein Mitglied des Rad6-Weges, nachweisen konnten (Bachl et al., 2006). Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Aktivität der SHM auch die Ubiquitinierung von PCNA bzw. Mitglieder des Rad6-Weges beeinflussen kann.

### 5.2.1 Untersuchungen zur Regulation der PCNA-Ubiquitinierung

Dazu wurden zunächst einmal Ubiquitinierungsassays mit B-Zelllinien von je zwei hypermutierenden (Raji und BL100) und zwei nicht hypermutierenden (P493.6 und BJAB) nach MMS-Behandlung durchgeführt. Bei allen getesteten Zelltypen war monoubiquitiniertes PCNA deutlich nachweisbar. Durch Erhöhung der MMS-Dosis ließ sich diese Modifikation in den beiden hypermutierenden Zelllinien deutlicher induzieren als in den beiden nicht hypermutierenden Linien, was aber wahrscheinlich auf die stärkere Vorinduktion von BJAB und P493.6-Zellen zurückzuführen ist, deren Ursache wir nicht genau klären konnten.

Man hätte möglicherweise das Gegenteil erwartet, d.h. dass bei unbehandelten, hypermutierenden Zellen der Anteil der Monoubiquitinierung höher sein sollte als in nicht-hypermutierenden Zellen, da AID in hypermutierenden Zellen stark aktiviert ist. Dies könnte zu einer höheren Anzahl an DNA-Läsionen und abasischen Stellen führen, die durch weitere Prozessierungen in ihrer Gesamtheit die DNA derart schädigen und blockieren könnten, dass es zu einer Aktivierung des Rad6-Weges kommen würde. Doch scheint die alleinige Aktivierung von AID in den von uns untersuchten hypermutierenden Zelllinien nicht dazu ausgereicht zu haben, um Unterschiede in der Rad6-Weg Aktivierung zu erkennen.

Mit der Auswahl dieser Zellen, die auch über einen unterschiedlichen p53-Status verfügen, wurde gleichzeitig der jüngst für einige humane Zelllinien gezeigte Zusammenhang des Rad6-Weges und p53 untersucht. Bei DNA-Schädigung wird demnach in p53-positiven, humanen Zellen das Effektormolekül p21 induziert, welches durch seine Bindung an PCNA genomweit zur Verdrängung replikativer Polymerasen führt und so die PCNA-Monoubiquitinierung erleichtern kann (Livneh, 2006). Daher haben wir erwartet, dass in



Zellen mit funktionellem p53 mehr Monoubiquitinierung nach MMS-Behandlung induziert wird als in Zellen ohne funktionelles p53. Bei unseren Experimenten mit verschiedenen B-Zellen konnten wir diesen Unterschied in Bezug auf Monoubiquitinierung von PCNA aber nicht ausmachen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass p21 in den von uns eingesetzten B-Zelllinien auch über andere Faktoren wie z.B. Bcl-6 herunterreguliert werden kann, so dass trotz erfolgter p53-Induktion keine effizientere PCNA-Monoubiquitinierung nachzuweisen ist (Hemann et al., 2005).

Zudem ist publiziert worden, dass eine Induktion von p53 in HCT-Zellen als Spätfolge zu einer Verringerung der Ubc13-Proteinmenge führen kann (Laine et al., 2006). Aber auch dieser regulatorische Zusammenhang zwischen p53 und Ubc13 ließ sich in den von uns untersuchten humanen B-Zelllinien nicht bestätigen. Um auszuschließen, dass dies auf Unregelmäßigkeiten der bisher verwendeten Zelllinien zurückzuführen ist, wurde der potentielle Zusammenhang von p53 und PCNA-Ubiquitinierung in einem genetisch genau definiertem System, in dem p53 komplett ausgeschaltet worden ist, nochmals untersucht: HCT116 p53<sup>+/+</sup>-Zellen und HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen (Vogelstein und Kinzler, 1992).

In HCT p53<sup>+/+</sup>-Zellen ließ sich, wie bereits in der Literatur beschrieben, auch in unseren Versuchen, bei Induktion von p53 und p21 durch IR eine Verringerung des Ubc13-Proteinlevels nach 24 h nachweisen. Eine Western Blot-Analyse in Hinblick auf Modifikationen von PCNA ergab jedoch keine Unterschiede, die auf den p53-Status zurückzuführen wären. Da dieser Zusammenhang ursprünglich nach UV-Behandlung aufgezeigt werden konnte (Avkin et al., 2006), sollte diese Methode auch in unserem Zellsystem eingesetzt und eine potentielle Beeinflussung der Monoubiquitinierung überprüft werden. Trotz UV-bedingter p53 und p21-Induktion im HCT-Zellsystem ergab weder die Analyse der Ubc13-Level noch die Untersuchung der PCNA-Monoubiquitinierung eine Regulation in Abhängigkeit vom p53-Status.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die HCT-Zellen nach UV-Behandlung zu kurz im Inkubator weiterkultiviert worden sind, um die vorher gezeigte Langzeitwirkung auf die Ubc13-Level detektieren zu können. Doch hat dieser Zeitraum laut Angaben aus der Literatur ausgereicht, um eine Beeinflussung der PCNA-Monoubiquitinierungsrate von H1299-Zellen (humane Lungen-Tumor-Zelllinie) und U2OS-Zellen (humane Osteosarkomzelllinie) in Abhängigkeit von p53 nachzuweisen. Da dies nicht durch unsere Experimente im HCT-Zellsystem bestätigt werden konnte, scheint es dabei aber zelltypbedingte regulatorische Unterschiede zu geben, so dass es fragwürdig

ist ob es sich hier um allgemein gültige Regulationsmechanismen der Monoubiquitinierung handelt.

### 5.2.2 Untersuchungen zur potentiellen Regulation von Ubc13 sowie anderen Mitgliedern des Rad6-Weges

Durch die Polyubiquitinierung von PCNA wird ein Mechanismus in Gang gesetzt, der die Zellen gegen Mutationen schützt, die bei dem alternativen Pfad des Rad6-Weges durch den Einsatz von TLS-Polymerasen entstehen würden (Chiu et al., 2006). Wir wollten untersuchen, ob dieser Wechsel auch in B-Zellen bei einer zu starken Ansammlung von DNA-Schäden stattfindet und sich dabei auf die Regulation des Rad6-Weges in Richtung fehlerfreie Reparatur auswirken kann. Da die Detektion der Polyubiquitinierung in Vertebraten mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich war, sollte der Einfluss auf den fehlerfreien Weg über eine potentielle Regulation von Ubc13 verfolgt werden.

Zur Induktion von DNA-Schäden wurden DT40-Zellen zunächst über mehrere Stunden mit MMS behandelt, womit aber keine reproduzierbare Einflussnahme auf die Ubc13-Proteinmenge gezeigt werden konnte. Durch eine Überexpression von AID in DT40-EZK haben wir im nächsten Schritt versucht, die Keimzentrumsreaktion von B-Zellen nachzustellen, da AID normalerweise während der Affinitätsreifung von B-Zellen stark induziert wird (Muramatsu et al., 1999). Auf Proteinebene konnte durch AID-Überexpression kein Einfluss auf die Ubc13-Menge gezeigt werden. Da zudem keine PCNA-Monoubiquitinierung durch AID induziert wurde ist jedoch fraglich, ob es bei der experimentellen Durchführung überhaupt zu einer Aktivierung des Rad6-Weges kam.

Der potentielle Einfluss der SHM auf Mitglieder des Rad6-Weges wurde zudem in verschiedenen humanen B-Zell-Lymphomlinien unter normalen Zellkulturbedingungen untersucht, so dass sich diese Zelllinien nur in ihrer Aktivität für die SHM unterscheiden. Durch technische Schwierigkeiten mit dem von uns verwendeten Rad18-Ak war es uns im Zuge dieses Experimentes zwar nicht möglich, Rad18 in allen Zelllinien eindeutig zu detektieren, doch zeigten weitere Untersuchungen mit dem Rad18-Ak in unserer Arbeitsgruppe, dass es keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Rad18-Mengen in hypermutierenden versus nicht hypermutierenden humanen Zelllinien zu geben scheint. Auch die Rad6-Proteinmenge schien im Allgemeinen nicht durch die SHM beeinflusst zu werden. Die Überprüfung der Expression von Ubc13 auf Proteinebene ergab ebenfalls in

allen untersuchten Zelllinien in etwa die gleiche Menge, so dass auch hier kein Einfluss der SHM-Rate aufgezeigt werden konnte. Auch quantitative real-time PCR-Untersuchungen für Ubc13, die für verschiedene Burkitt-Zelllinien durchgeführt worden sind, ergaben keine substanziellen Unterschiede, so dass das Hypermutationspotential der Zelllinien nicht mit einer differenzierten Expression diesen wesentlichen Regulators des fehlerfreien Arms des Rad6-Weges gekoppelt zu sein scheint.

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die von uns untersuchten Mitglieder dieses Reparaturweges Rad6, Rad18 und Ubc13 daneben andere wichtige zelluläre Funktionen wie z.B. bei der Einzelstrangbruchreparatur, HR, Meiose, Spermatogenese, Proteindegradation und Signaltransduktion erfüllen, so dass die Proteinmengen in der Zelle, auch während der SHM auf einem relativ konstanten Level gehalten werden müssen (Cox und Parry, 1968; Eddins et al., 2006; Huang et al., 1997; Picologlou et al., 1990; Shiomi et al., 2007; Sung et al., 1990; van der Laan et al., 2004).

Auch eine Regulation des Rad6-Weges über die Aktivität des Proteasoms wäre denkbar, die eine differenzierte Expression einzelner Mitglieder dieses Reparaturweges überflüssig werden lässt. In B-Zellen wird das Proteosom stark beansprucht, da die Zellen durch diese Protease in der Lage sind Ag-Epitope auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und dadurch weitere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren können (Goldberg et al., 2002). Gleichzeitig hat das Proteosom aber auch die wichtige Funktion, ubiquitinierte Proteine abzubauen, so dass eine Inhibierung des Proteasoms zu einer Ansammlung ubiquitiniertes Proteine in der Zelle führt (Pickart, 1997). Dies kann einen allgemeinen Ubiquitinmangel in den Zellen bewirken. Ist keine ausreichende Menge von Ubiquitin verfügbar, wird aber gleichzeitig die Aktivität von Ubiquitinkonjugierenden Enzymen wie Ubc13 eingeschränkt, was zu einer Verringerung der HR-Rate führen sollte. In Säugerzellen die mit einem spezifischen Proteasom-Inhibitor behandelt worden sind, konnte genau dieser Zusammenhang bereits belegt werden (Murakawa et al., 2007), so dass auch in unseren Experimenten eine Regulation des Rad6-Weges nicht durch die Expressionslevel einzelner Mitglieder, sondern über die den Zellen zur Verfügung stehende Ubiquitin-Menge erfolgen könnte.

### 5.3 Rolle von Ubc13 bei Ig-Diversifizierungsprozessen in Vertebraten

Der dritte Teil dieser Doktorarbeit widmet sich der Untersuchung des Einflusses von Ubc13 auf Diversifizierungsprozesse zur Erzeugung der Ak-Vielfalt von B-Zellen (Ig-Genkonversion und SHM). Wir haben uns dabei bewusst für das Modellsystem DT40 entschieden, da es als genetisch stabiles System beschrieben wird, in dem sich einzelne Gene im Gegensatz zu vielen anderen B-Zelllinien leicht inaktivieren lassen. Dies ist der hohen Rate für gerichtete Integration von DT40-Zellen zuzuschreiben (Buerstedde et al., 1990; Buerstedde and Takeda, 1991).

#### 5.3.1 Untersuchungen der Ig-Genkonversion nach Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in DT40Cre1-Zellen

Aus Vorversuchen meiner Diplomarbeit war uns bekannt, dass die komplette Inaktivierung von Ubc13 in DT40-Zellen auf direktem Weg nicht möglich ist. Dies haben wir damals damit begründet, dass Ubc13 wahrscheinlich eine zu wichtige Rolle bei der HR von DT40-Zellen einnimmt, so dass ein Totalverlust von Ubc13 für die Zellen lethal wäre. Jüngst konnte unsere Vermutung bestätigt werden, in dem gezeigt wurde, dass Ubc13 in bei der Initiierung der HR von Vertebraten benötigt wird (Zhao et al., 2007). Eine komplette Inaktivierung von Ubc13 über konditionale Methoden ist zwar prinzipiell möglich, doch ist die Proliferation von Ubc13<sup>-/-</sup>-Zellen beeinträchtigt, so dass sich langwierige Versuche wie Ig-Genkonversionsassays nur schwer mit solchen Zellen durchführen lassen würden. Daher haben wir uns zunächst auf Experimente mit Zellen beschränkt, in denen nur ein Ubc13-Allel ausgeschaltet worden war.

Dies wurde durch stabile Integration eines von uns generierten, homologen Ubc13-*targeting*-Vektors in den endogenen Ubc13-Lokus von DT40Cre1-Zellen erreicht. Durch Überprüfung der gerichteten Integration über PCR auf Integration im 5' Bereich sowie Southern Blot Analyse auf Integration im 3' Bereich konnten zwei unabhängige Ubc13<sup>+/-</sup>-Einzelzellklone bestätigt werden. Da sich bereits durch erste Vorexperimente mit den heterozygoten Zellen (Ubc13<sup>+/-</sup>) eine Einflussnahme auf die Ig-Genkonversionsrate nachweisen ließ, wurde Ubc13 in diesen Zellen durch die Transfektion mit einem Überexpressionsvektor rekonstituiert. Dabei sind erneut zwei verschiedene Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klone generiert worden.

Eine Western Blot Analyse mit einem anti-Ubc13 Ak konnte in beiden Ubc13<sup>+/-</sup>-Klonen auch auf Proteinebene nachweisen, dass diese weniger Ubc13-Protein exprimieren als die parentale Zelllinie DT40Cre1. Die beiden rekonstituierten Zellklone exprimierten hingegen

wieder erhöhte Ubc13-Proteinmengen, wobei diese beim Zelltyp Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klon 1 in etwa der parentalen Zelllinie und beim Zelltyp Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klon 2 in etwa der doppelten Ubc13-Proteinmenge entsprachen. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Überexpressionsvektor in den beiden heterozygoten Klonen an verschiedenen Stellen im DT40-Genom integriert haben muss, die wahrscheinlich auf Transkriptionsebene unterschiedlich reguliert werden. Auch könnte eine unterschiedliche Anzahl an Kopien des Rekonstitutionsvektors diese ungleichen Proteinmengen bedingt haben. Zusammen mit der parentalen Zelllinie DT40Cre1 und DT40AID<sup>-/-</sup>, die sich durch einen Defekt der Ig-Genkonversion auszeichnen (Arakawa et al., 2004; Harris et al., 2002), ergab sich das Zellset<sup>Ig-GC</sup> mit insgesamt sechs verschiedenen Zelllinien zur Untersuchung der Ig-Genkonversion im DT40-System.

Bei dem von uns eingesetzten Ig-Genkonversionsassay handelt es sich um einen Oberflächen-Ig-Reversionsassay, bei dem der Prozess der Ig-Genkonversion, eine Rekombination einzelner Gensegmente von Pseudogenen ( $\Psi V$ ) mit dem VJ $_{\lambda}$ -Lokus, aus vormals IgM<sup>neg</sup>-Zellen langsam IgM<sup>pos</sup>-Zellen entstehen lässt (Buerstedde et al., 1990). Durch Inkubation der Zellen mit einem fluoreszierenden Ak gegen IgM und eine sich anschließende FACS-Analyse kann dabei die Rate an IgM<sup>pos</sup> Zellen und damit Ig-Genkonversionsaktivität quantitativ im DT40-System bestimmt werden. Um dabei alle Ig-Genkonversionsereignisse detektieren zu können, müssen aber zunächst IgM<sup>neg</sup> Zellpopulationen isoliert werden. Durch den Einsatz von MACS-Depletionssäulen ist uns dies sehr gut gelungen, so dass ausgehend von diesen Populationen ca. 25 EZK generiert werden konnten, für die nach mehrwöchiger Kultivierung die Ig-Genkonversionsrate bestimmt wurde.

Wie erwartet, zeigten dabei unsere beiden Referenzzelllinien, DT40Cre1, mit einer hohen Rate an Ig-Genkonversion sowie DT40AID<sup>-/-</sup>-Zellen, ohne Ig-Genkonversionsaktivität, den größten Unterschied (Arakawa et al., 2002; Buerstedde et al., 1990). Die Varianz zwischen den untersuchten Einzelzellklonen innerhalb einer Zelllinie ermöglicht erst nach statistischer Auswertung eine konkrete Aussage zur Ig-Genkonversionsaktivität (Buerstedde et al., 1990). Diese Auswertung wurde mit Hilfe eines *student's t-test* durchgeführt und zeigte bei Vergleich von DT40Cre1 und DT40AID<sup>-/-</sup> eine statistisch hohe Signifikanz. Da für den Prozess der Ig-Genkonversion das Enzym AID unabdingbar ist, ist die Rate von 0,3 % IgM<sup>pos</sup>-Zellen wahrscheinlich auf einen Färbehintergrund des verwendeten FACS-Ak zurückzuführen.

Für beide Ubc13<sup>+/-</sup>-Klone zeigte sich im Vergleich zu DT40Cre1-Zellen eine statistisch hoch signifikante Verminderung der Ig-Genkonversionsrate. Dieser starke Effekt wird in

den beiden rekonstituierten Klonen, wenn auch nicht im selben Ausmaß, wieder aufgehoben, d.h. es besteht kein signifikanter Unterschied bei Vergleich mit der Cre1-Zelllinie. Interessanterweise geht bei dem rekonstituierten Klon mit physiologischer Menge an Ubc13 (Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klon 1) die Rate an Ig-Genkonversion fast auf die ursprüngliche Rate der parentalen Cre1-Zellen zurück, während diese bei dem rekonstituierten Klon mit etwa doppelter Ubc13-Menge (Ubc13<sup>+/-R</sup>-Klon 2) unter der Ig-Genkonversionsrate für Cre1-Zellen bleibt.

Eine Erklärung dafür wäre, dass in Zellen mit einem Ubc13-Anteil der über dem physiologischen Level liegt, der Ubiquitinierung durch Ubc13 gegenreguliert werden könnte. So konnte gezeigt werden, dass der Deubiquitinierungskomplex aus Rap80 und BRCC36 als Gegenspieler zur RNF8-Ubc13 abhängigen Ubiquitinierung von Chromatin an DSB fungieren kann (Shao et al., 2009). Aufgrund der Schlüsselfunktion von Ubc13 bei der Regulation des NFκB-Weges würde eine Gegenregulation zur Ubiquitinierung auch in B-Zellen biologisch sinnvoll erscheinen, da einige Studien bereits zeigen konnten, dass eine Überaktivierung des NFκB-Weges zur Lymphomentstehung beitragen kann (Dixit und Mak, 2002; Yamamoto et al., 2006).

Um die Daten des Assays zu stützen, sollten die FACS-Ergebnisse der von uns untersuchten EZK durch Sequenzierungen des VJ<sub>λ</sub>-Lokus der leichten Kette, in denen die Rekombinationsereignisse stattfinden, untermauert werden. Um mögliche Unterschiede auf Sequenzebene detektieren zu können, musste durch eine längere Kultivierung zunächst der Anteil an Rekombinationsereignissen in repräsentativen EZK aller Zelllinien erhöht werden. Untersuchungen von je 24 zu einem EZK zugehörigen Einzelsequenzen konnten erneut bestätigen, dass die Rate an Ig-Genkonversion schon durch eine Verringerung der Ubc13-Dosis in beiden Ubc13<sup>+/-</sup>-Klonen deutlich gesenkt wird. Nach Abgleich der Sequenzdaten mit Cre1-Zellen konnten in den beiden heterozygoten Klonen nur zwei Veränderungen auf Genomebene festgestellt werden. Bei Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 1 handelte es sich dabei um eine Duplikation aus dem Bereich vor dem CDR1-Lokus, beim Ubc13<sup>+/-</sup>-Klon 2 wahrscheinlich um ein Fragment des Pseudogens 14. In den Sequenzen der Cre1-Zelllinie konnten hingegen zehn verschiedene Genkonversionsereignisse nachgewiesen werden. Dabei konnten Fragmente der Pseudogene 5 und 8 sogar mehrmals detektiert werden, was wahrscheinlich auf eine erhöhte Homologie dieser Pseudogene zu dem rearrangierten VJ<sub>λ</sub>-Bereich zurückzuführen ist (Arakawa et al., 2002).

Insgesamt war die Zuordnung der Pseudogene relativ schwer durchzuführen, da sich diese sehr stark ähneln. Zudem sind die einzigen, frei zugänglichen Informationen zur

Sequenz dieser Gene über 20 Jahre alt, so dass bereits bei Abgleich der Konsensus-Sequenzen viele Veränderungen festgestellt wurden. Daher können wir nach Sequenzvergleich mit den veröffentlichten Pseudogensequenzen, wie andere Arbeitsgruppen auch, nur von dem wahrscheinlichsten Pseudogen-Donor sprechen, dass rekombiniert hat (Arakawa et al., 2002; Reynaud et al., 1987). Mit den derzeit zur Verfügung stehenden, neuen Sequenziermethoden ließe sich eine Aktualisierung der Sequenzdaten des VJ $\lambda$ -Bereiches sehr leicht durchführen, was den Abgleich der Sequenzen in Zukunft vereinfachen würde.

In den untersuchten Sequenzen der EZK konnten keine weiteren Veränderungen, wie z.B. einzelne Punktmutationen die auf SHM hinweisen würden, festgestellt werden. Deshalb sind wir davon ausgegangen, dass die Mutationsrate durch SHM, die für Cre1 als sehr niedrig beschrieben wird, auch in allen anderen Zelllinien unseres Zellsets<sup>Ig-GC</sup> unverändert blieb (Simpson und Sale 2003; Niedzwiedz et al. 2004). Um diesen ersten Hinweis auf die unveränderte SHM-Aktivität zu konkretisieren war es aber zunächst nötig, die SHM in einer anderen DT40-Zelllinie, die extra für die Untersuchung dieses Prozesses generiert worden ist, näher zu untersuchen (Arakawa et al., 2002).

Es ist uns gelungen, mit zwei verschiedenen Methoden aufzuzeigen, dass die Ubc13-Dosis einen wichtigen Einfluss auf die Ig-Genkonversionsaktivität von DT40-Zellen hat. Dies wurde so noch nie beobachtet, zeigt aber, welche wichtige Rolle das Protein Ubc13 bei der Ig-Diversifikation von Vertebraten einnimmt. Nachdem jüngst die wichtige Rolle von Ubc13 bei der Initiation der HR gezeigt werden konnte (Zhao et al., 2007), scheint die Ig-GC einzelne Proteine der HR für diesen Prozess adaptiert zu haben.

### 5.3.2 Rolle von Ubc13 bei Proliferation und DNA-Reparatur

Um auszuschließen, dass die verminderte Rate an Ig-Genkonversion in den heterozygoten Klonen (Ubc13<sup>+/-</sup>) auf andere Ursachen wie z.B. Unterschiede in der Proliferation oder generelle, andere Defekte im Metabolismus zurückzuführen sind, wurden zusätzliche Untersuchungen unseres Zellsets<sup>Ig-GC</sup> durchgeführt. Zunächst wurde in einem Proliferationsassay mit dem Farbstoff CFDA die Generationszeit der Zelllinien bestimmt. Dieser Assay beruht darauf, dass bei jeder Teilung der Farbstoffanteil der Zellen proportional abnimmt, so dass mit einer FACS-Analyse über mehrere Tage die Fluoreszenz der gefärbten Zellen gemessen, als Funktion der Zeit dargestellt und daraus die

Proliferationsrate ermittelt werden kann. Unsere Untersuchungen zur Proliferation ergaben für alle Zelllinien unseres Zellsets in etwa die gleiche Generationszeit von ca. 11 h. Dies belegt, dass die verminderte Ig-Genkonversionsrate nicht auf Proliferationsdefekte der Ubc13<sup>+/-</sup>-Klone zurückgeführt werden kann.

Mit einem Methylzellulose-Kolonie-Überlebensassay wurde zudem die Reparaturkapazität der heterozygoten Zellen bei massiver exogener Schädigung durch das Agenz Cisplatin gemessen. Cisplatin ist ein Zytostatikum, das vor allem bei der Behandlung von Hoden-, Ovarial-, Blasen- und Lungenkarzinomen, sowie gegen Tumore im Hals-Kopf-Bereich eingesetzt wird (Rosenberg, 1977). Das Agenz stellt mit seinem Zentralatom Platin einen planaren Komplex mit Chlorid- und Amminliganden dar, der aufgrund seiner elektrophilen Eigenschaften bevorzugt mit dem N<sub>7</sub>-Atom von Guanin und Adenin reagiert. Auf diese Weise entstehen innerhalb eines DNA-Stranges Intrastrang- und zwischen benachbarten DNA-Strängen Interstrangquervernetzungen, so dass die DNA-Replikation sowie Transkription gehemmt werden kann (Dronkert und Kanaar, 2001; Jordan und Carmo-Fonseca, 2000). Vorversuche unserer Arbeitsgruppe mit DT40Rad18<sup>-/-</sup> Zellen (N. Tomi, Diplomarbeit) sowie andere Versuche mit Ubc13<sup>-/-</sup>-Zellen haben gezeigt (Zhao et al., 2007), dass diese besonders sensitiv auf eine Behandlung mit Cisplatin reagieren, so dass wir davon ausgehen, dass die PRR bzw. HR eine wichtige Rolle bei der Reparatur dieser Schäden in DT40-Zellen einnimmt.

Die Überlebenskurve, die durch Auszählen der überlebenden Kolonien nach Behandlung mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin ermittelt werden konnte, verlief für alle Zelllinien des Zellsets<sup>Ig-GC</sup> ähnlich. Nur die mitgeführte Kontrollzelllinie Rad18<sup>-/-</sup> starb bereits bei geringen Konzentrationen der Droge. Dies zeigt, dass endogene Schäden die durch die Funktion von AID bedingt sein könnten, zu einer messbaren Verminderung der Ig-Genkonversionsrate in Ubc13<sup>+/-</sup>-Klonen führen, während eine massive Schädigung der DNA keinen Überlebensnachteil dieser Zelllinie aufzeigt. Ein möglicher Grund, warum Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen keinen Reparaturdefekt aufweisen, könnte eine Kompensation der Schädigung über weitere Reparaturmechanismen wie z.B. die NER, BER sowie den FANC-*pathway* (ein weiterer Stressreparaturweg von Vertebraten) sein, deren Aktivität bei starker DNA-Schädigung durch DNA-Quervernetzung hochreguliert wird (Nojima et al., 2005), so dass auch nach Cisplatinbehandlung eine Übernahme durch einen anderen Reparaturweg sehr wahrscheinlich ist.



### 5.3.3 Untersuchungen der somatischen Hypermutation nach Inaktivierung eines Ubc13-Allels in DT40 $\Psi$ V<sup>-/-</sup>AID<sup>R</sup> Zellen

Aufgrund der Präferenz von DT40Cre1-Zellen für die Ig-GC können Hypermutationsereignisse in dieser Zelllinie nur im geringen Maß detektiert werden (Arakawa und Buerstedde, 2004). Es ist aber bereits eine besondere DT40-Zelllinie generiert und beschrieben worden, in welcher diese Präferenz durch den *knockout* aller Pseudogene ( $\Psi$ V) in Richtung SHM verändert werden konnte (Arakawa et al., 2002).

Deshalb wurde analog zur Inaktivierung von Ubc13 in Cre1-Zellen ein *targeting*-Vektor zur Transfektion von  $\Psi$ V<sup>-/-</sup>AID<sup>R</sup>-Zellen konzipiert. Die Integration des Vektors konnte durch PCR und Southern-Blot für einen heterozygoten Klon bestätigt werden (Ubc13<sup>+/-</sup> $\Psi$ V<sup>-/-</sup>AID<sup>R</sup>-Klon). Dieser wurde im Anschluss daran rekonstituiert (Ubc13<sup>+/-R</sup> $\Psi$ V<sup>-/-</sup>AID<sup>R</sup>), so dass sich zusammen mit der parentalen Zelllinie und der Negativkontrolle des SHM-Assays,  $\Psi$ V<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>-Zellen, das Zellset<sup>SHM</sup> mit vier verschiedenen Zelllinien ergab. Eine sich anschließende Analyse mit einem Western-Blot zeigte, dass die Ubc13-Proteinmenge in dem heterozygoten Klon deutlich reduziert wird und durch die Rekonstitution wieder auf das physiologische Grundlevel zurückgeht. Obwohl das DT40-System als genetisch stabiles System beschrieben wird (Buerstedde und Takeda, 1991), war die AID-Proteinmenge des heterozygoten und des rekonstituierten Klons nicht absolut identisch. Dieser exzeptionelle, intraklonale Unterschied musste bei der Interpretation der Daten des sich anschließenden SHM-Assays berücksichtigt werden.

Zudem war die *targeting*-Effizienz für Ubc13 in  $\Psi$ V<sup>-/-</sup>-Zellen erheblich geringer als in Cre1-Zellen. Diese geringe *targeting*-Effizienz zeigte sich auch bei Experimenten zur Deaktivierung von SHPRH, einer der E3-Ligasen des Rad6-Weges (D. Grotzky, Diplomarbeit). Dies könnte durch die Überexpression von AID in  $\Psi$ V<sup>-/-</sup>-Zellen bedingt sein, dessen starke Aktivität eventuell den Anteil an genomweiten DNA-Schäden in dem Maß erhöht, dass schon das Ausschalten eines Ubc13-Allels für die Zellen schwierig zu tolerieren ist. Die Schlüsselfunktion von Ubc13 bei der Regulation des fehlerfreien Pfades des Rad6-Weges könnte ein Grund hierfür sein. Neben einer gezielten Einführung von AID-generierten Läsionen in den V-Regionen des Ig-Lokus konnte eine Schädigung anderer Genombereiche durch AID bereits gezeigt werden (Pasqualucci et al., 1998), welche meist fehlerfrei repariert werden (Liu et al., 2008). Dabei könnten Proteine, wie Ubc13, die am fehlerfreien Pfad des Rad6-Weges beteiligt sind durchaus eine Rolle spielen. Diese Hypothese könnte durch die Bestimmung der *targeting*-Effizienz von  $\Psi$ V<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>-Zellen überprüft werden. Da in dieser Zelllinie der AID-Überexpressionsvektor entfernt

worden ist, sollte sich die *targeting*-Effizienz wieder erhöhen lassen. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zum *targeting* verwendeten  $\Psi V^{-/-}$ -Zellen einen anderen Defekt aufweisen, der zu dieser geringen *targeting*-Effizienz geführt hat. Doch gibt es dazu bisher keine Hinweise aus der Literatur.

Die SHM kann durch eine Ansammlung von Stopp oder *nonsense*-Mutationen in den *hotspot*-Bereichen der VJ-Gene dazu führen, dass B-Zellen kein IgM mehr auf der Oberfläche exprimieren können (IgM<sup>neg</sup>). Diese Reversion von IgM<sup>pos</sup>-Zellen zu IgM<sup>neg</sup>-Zellen kann mit Hilfe des SHM-Assays bestimmt werden. Durch FACS-Analysen mit einem gegen den Oberflächenmarker IgM gerichteten Ak lässt sich dabei die SHM verfolgen und quantitativ messen. Die dazu benötigten IgM<sup>pos</sup>-Populationen konnten durch den Einsatz von MACS-Separationssäulen isoliert und in Anschluss daran hieraus ca. 25 EZK pro Zelltyp generiert werden.

Nur der direkte Vergleich von parentalen  $\Psi V^{-/-} AID^{high}$ -Zellen und der Negativkontrolle,  $\Psi V^{-/-} AID^{-/-}$ -Zellen, konnte einen statistisch signifikanten Unterschied in der SHM-Aktivität aufzeigen. In allen von uns durchgeführten Experimenten gab es keinen nennenswerten Unterschied zwischen dem heterozygoten Klon und der parentalen Zelllinie, so dass wir keinen Einfluss der Ubc13-Dosis auf den Prozess der SHM nachweisen konnten.

Die FACS-Daten des Assays konnten durch Sequenzdaten der VJ-Gensegmente bestätigt werden. Dazu wurden je 48 zu einem EZK zugehörige Einzelsequenzen der parentalen Zelllinie, heterozygoten Zelllinie, sowie der Negativkontrolle miteinander verglichen. Diese zeigten eine ganz leichte Erhöhung der Mutationsrate für die heterozygote Zelllinie von  $1,23 \times 10^{-3}$  Mut./bp auf  $1,57 \times 10^{-3}$  Mut./bp. Doch ist dies vor allem dem hohen Anteil an Mutationen einer einzelnen aus insgesamt 48 untersuchten Sequenzen des heterozygoten Klons zurückzuführen und bei statistischer Analyse der Mutationsraten unbedeutend, so dass es insgesamt betrachtet keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien gibt. Damit ist die Ubc13-Dosis nur für die Aktivität der Ig-Genkonversion, nicht aber für die SHM-Aktivität von Bedeutung.

Bei Defekten der HR konnte bereits ein *shift* zur SHM für DT40-Mutanten von Rad51 Paralogen wie XRCC2, XRCC3, Rad51B sowie BRCA2 gezeigt werden, die für die ersten Schritte der Ig-Genkonversion wie Strandinvasion in den homologen DNA-Bereich von Bedeutung sind (Sale et al., 2001; Yabuki et al., 2005). Beim Ausschalten anderer Faktoren, die erst bei darauf folgenden Schritten der Ig-Genkonversion eine Rolle spielen, wie z.B. Rad54, FANCC sowie FANCD2, wurde hingegen nur die Rate an Ig-Genkonversion verringert ohne die SHM-Rate zu erhöhen (Bezzubova et al., 1997;

Niedzwiedz et al., 2004; Yamamoto et al., 2005). Dies lässt sich mit einem Model erklären, in dem es keine Möglichkeit mehr gibt die Rate an SHM in DT40-Zellen zu erhöhen, wenn eine Invasion in den homologen Strang bereits stattgefunden hat. Nur das Ausschalten früher Faktoren der Ig-Genkonversion würde somit eine Zunahme der SHM bewirken (Sale et al., 2001; Sale et al., 2004).

Andere Studien mit DT40-Zellen haben gezeigt, dass erst bei einem kompletten Block der Ig-Genkonversion eine Verschiebung in Richtung SHM erfolgt (Saribasak et al., 2006). Da wir den Einfluss von Ubc13 mit heterozygoten Zellen untersucht haben, die zwar eine prägnante Verminderung der Ig-Genkonversion, aber trotzdem nur eine partielle Blockade dieses Prozesses aufweisen, könnte die Restaktivität der Ig-Genkonversion in diesen Zellen noch dazu ausreichen, um die durch AID generierten Schäden zu reparieren. Dies würde vor allem das Ergebnis des Ig-Genkonversionsassays im genetischen Cre1-Hintergrund erklären, das nach Auswertung der Sequenzdaten keine Erhöhung der SHM-Rate gezeigt hat. Wenn es eine direkte Konkurrenz von HR und TLS geben sollte, hätten wir erwartet, dass bei einer starken Überexpression von AID, wie im genetischen  $\Psi V^{-/-} AID^{high}$ -Hintergrund, die Rate an SHM zunimmt um diese zusätzlichen, durch AID-generierten Schäden reparieren zu können.

Studien mit DT40-Zellen, die einen Defekt für Faktoren der NHEJ aufweisen konnten zeigen, dass die Ig-Genkonversionsrate erhöht wird. Damit konnte bewiesen werden, dass die Ig-Genkonversion durch DSB initiiert werden kann (Tang und Martin, 2006). Dadurch kommt es am DSB zu einer Konkurrenz der beiden Hauptreparaturwege der DSB-Reparatur in Vertebraten, NHEJ und HR (Helleday, 2003). Ein Defekt der HR sollte also demnach zu einer Erhöhung der NHEJ führen, die im Vergleich zur TLS DNA-Schäden relativ fehlerfrei repariert, so dass sich, wie in unseren Sequenzdaten gezeigt, keine zusätzlichen Mutationen im Genom nachweisen lassen.

Die Verringerung der HR-Rate zugunsten der NHEJ sollte sich nicht nur auf die Aktivität der Ig-Genkonversion im Ig-Lokus, sondern auch auf die *targeting*-Effizienz von Vektoren, die an anderer Stelle im Genom integrieren, aufzeigen lassen. Dies würde bedeuten, dass in heterozygoten Zellen die *targeting*-Effizienz geringer ist als in der parentalen Zelllinie und einhergehend damit die Rate an NHEJ in Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen zunehmen sollte. Diese These wollten wir anhand eines *targeting*-Experiments überprüfen.

### 5.3.4 Beeinflussung der gerichteten Integration durch Ubc13-Level

Je 45 transfizierte EZK aus DT40Cre1 sowie den beiden heterozygoten Klonen im genetischen Cre1-Hintergrund wurden auf gerichtete Integration eines *targeting*-Vektors gegen Rad18 untersucht. Per PCR konnte eine deutliche Verringerung der gerichteten Integration in den beiden heterozygoten Klonen auf  $\frac{1}{4}$  der Rate von Cre1-Zellen ausgemacht werden. Da die EZK während der Versuchsdurchführung auf Integration des Vektors selektioniert worden sind, entsprechen die restlichen prozentualen Anteile der Rate an NHEJ. Dies zeigt, dass bereits in Zellen mit verringerter Ubc13-Dosis die Balance der DSB-Reparatur dahingehend verändert wird, dass diese die entstehenden DSB überwiegend über NHEJ reparieren. Diese Verschiebung könnte durch die jüngst gezeigte Rolle von Ubc13 bei der Initiation der HR durch Mikrofilamentbildung noch zusätzlich verstärkt werden (Zhao et al., 2007).

Mit diesem abschließenden Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die verminderte Rate an Ig-GC in Ubc13<sup>+/-</sup>-Zellen durch eine Erhöhung der NHEJ kompensiert wird. Dies bezieht sich nicht nur auf Läsionen im Ig-Lokus sondern auf das gesamte Genom, da auch die Rate für gerichtete Integration des verwendeten Rad18-*targeting*-Vektors in den heterozygoten Klonen abgenommen hat. Das Ausmaß dieser Verschiebung scheint sich aber in den heterozygoten Zellen nicht auf die allgemeine Toleranz exogener Schädigung oder aber Proliferation der Zellen auszuwirken wie durch Methylcellulose-Überlebensassays und Proliferationsassays gezeigt werden konnte.

## 5.4 Ausblick

---

Der Rad6-Weg konnte durch neue Studien mit DT40Rad18<sup>-/-</sup>-Zellen und der DT40-Mutante<sup>K164R</sup> in einen funktionellen Zusammenhang mit der SHM gebracht werden (Arakawa et al., 2006; Bachl et al., 2006). Über die Rolle des fehlerarmen Pfades des Rad6-Weges bei der Regulation der SHM ist jedoch noch nichts bekannt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle von Ubc13, einem E2-Enzym das dem fehlerfreien Pfad des Rad6-Weges zugeordnet werden kann, bei Ig-Diversifizierungsprozessen wie der SHM und der Ig-Genkonversion genauer untersucht. Dabei konnte eine Regulation der Ig-Genkonversion durch die Ubc13-Dosis belegt werden, wodurch sich dem Ubiquitinkonjugierenden Enzym Ubc13 eine weitere wichtige Funktion bei der Ig-Diversifizierung zuordnen lässt. Die Rate an SHM war hingegen von der Ubc13-Dosis unbeeinflusst.

Damit ließe sich vielleicht die *targeting*-Effizienz von Vektoren über die Dosis an Ubc13 steuern, ohne dabei an anderer Stelle im Genom die Mutagenese zu erhöhen. Dieser Zusammenhang könnte eine Anwendung in der Gentherapie finden, da durch Erhöhung der HR-Rate das betroffene Zielgen besser gerichtet manipuliert und so zu weniger Nebenwirkungen einer Gentherapie führen könnte. Da sich eine Regulation der Ubc13-Level wahrscheinlich aufgrund der vielseitigen Funktionen dieses Proteins nur schwer durchführen lässt, könnten in Zukunft während einer Therapie deubiquitinierende Enzyme gezielt gehemmt werden um so die HR-Rate der Zellen um ein vielfaches zu erhöhen. Eine Zugabe von Proteasominhibitoren könnte diesen Effekt zusätzlich verstärken.

Ubc13 ist das einzige bekannte Ubiquitinkonjugierende Enzym, das eine über K63-verknüpfte Polyubiquitinierung durchführen kann und nimmt dadurch eine Sonderrolle in der Zelle mit vielen unterschiedlichen Funktionen ein (Eddins et al., 2006; Petroski et al., 2007). Erst neuere Untersuchungen konnten SHPRH, HLTF, RNF8 sowie RNF168 als E3-Ligasen identifizieren, die mit Ubc13 interagieren können (Sood et al., 2003; Unk et al., 2008; (Doil et al., 2009; Kolas et al., 2007; Shao et al., 2009; Wang und Elledge, 2007)). So bleibt also abzuwarten, ob *knockin/knockout*-Experimente dieser E3-Ligasen in der Zukunft mehr über die Regulation der SHM aufzeigen und damit die Rolle des fehlerfreien Pfades des Rad6-Weges bei diesem wichtigen Ig-Diversifizierungsprozess in Vertebraten aufklären können.

## 6 Materialien & Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystems (Foster City, USA), BD Biosciences (Heidelberg), Biochrom (Berlin), BioRad (München), Bruker Daltonik (Bremen), Costar (Bodenheim), Dianova (Hamburg), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Taufkirchen-München), GE Healthcare Europe (ehemalig Amersham Biosciences, Freiburg), Greiner (Frickenhausen, Nürtlingen), Integra Biosciences (Fernwald), Invitrogen (Karlsruhe), Kodak (Rochester, USA), Labor Schubert & Weiß GmbH (München), Laborteam K+K (München), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Millipore (Bedford, USA), MP Biomedicals (Eschwege), NEB (Schwalbach), neolab (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), PAA (Pasching, Österreich), Perbio Science (Bonn), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen-München), Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

#### 6.1.2 Kits

Folgende Kits wurden verwendet:

DC Protein Assay (BioRad, München); ECL Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne); QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); QIAGEN PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden).

#### 6.1.3 Geräte

Blot-Tank / Mighty Small	Transphor Hoefler, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules, USA
Elektroporator	BioRad, Hercules, USA
Entwicklermaschine	CAVOMAT Christiansen GmbH, München
FACSCalibur	Becton Dickinson, USA
Inkubator	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
MACS-System	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Zeiss, Jena
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Köln
Power Pac 3000/Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Tischzentrifuge	Eppendorf, Köln
Zentrifuge	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Zählkammer	Schubert & Weiss

## 6.1.4 Datenverarbeitung

Adobe Photoshop	Bildverarbeitung
CellQuest	FACS Datenaquisition und -auswertung
Chromas	Sequenzauswertung
Clustal W	Sequenzverarbeitung
Microsoft Excel	Tabellenkalkulation
Microsoft Word	Textverarbeitung
Power Point	Abbildungen
Sci Ed Central	Sequenzverarbeitung

## 6.1.5 Größenmarker

### 6.1.5.1 DNA-Größenstandard

Um DNA-Fragmente, die mit einem Agarosegel aufgetrennt wurden, besser abschätzen zu können, ist zusammen mit den Proben ein DNA-Größenstandard geladen worden. Der verwendete Standard ist der DNA-Standard „Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

### 6.1.5.2 Protein-Größenstandard

Um das Molekulargewicht von Proteinen bestimmen zu können, die mit einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt worden sind, wurde ein Proteinstandard benutzt. Dieser enthält 10 verschiedene Proteine mit einer Größe zwischen 11 und 170 kDa. Für eine bessere Orientierung im Gel ist das ca. 72 kDa große Protein mit einem roten Farbstoff gekoppelt, wohingegen alle anderen Proteine des Proteinstandards an einen blauen Farbstoff gebunden sind. Der verwendete Standard ist der Proteinstandard „Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe).

## 6.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), NEB (Schwalbach) und Roche Applied Science (Mannheim) bezogen und mit den jeweils empfohlenen Puffern und Zusätzen gebraucht.

*Taq*-Polymerase kam von Roche Applied Science (Mannheim) und Qiagen (Hilden). TurboPfu-Polymerase wurde von Stratagen (Amsterdam, Niederlande) erstanden. *Expand-long-template*-Polymerase wurde von Roche Applied Science (Mannheim) bezogen. T4-

DNA-Ligase und alkalische Phosphatase (CIP) wurden von Roche Applied Science (Mannheim) bezogen. Proteinase K wurde von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) erstanden.

### 6.1.7 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 $\alpha$  benutzt. Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ dlacZ  $\Delta$  M15, endA1, recA1, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>-</sup>), supE44, Thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>.

### 6.1.8 Plasmide

#### pBSUbc13Puro bzw Bsr

Die Ubc13-Vektoren zur gerichteten Integration in DT40-Zellen basieren auf dem pBS-Vektor (Bluescript). Der 5' *targeting*-Arm für Ubc13 wurde mit den Primern 13Ub1 und 13Ub2 aus genomischer DT40Cre1-DNA amplifiziert. Der 3' *targeting*-Arm für Ubc13 wurde mit den Primern 13Ub3 und 13Ub4 amplifiziert. Beide Sequenzen wurden in die MCS des Vektors hineinkloniert. In einem weiteren Klonierungsschritt wurde zudem die Resistenzkassette aus dem plox-Vektor (siehe nächster Abschnitt) mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin oder Blasticidin in den Vektor eingefügt. Diese sind an beiden Seiten durch loxP-Stellen flankiert, so dass die Resistenzkassette durch Cre-Aktivierung aus dem Vektor entfernt werden kann.

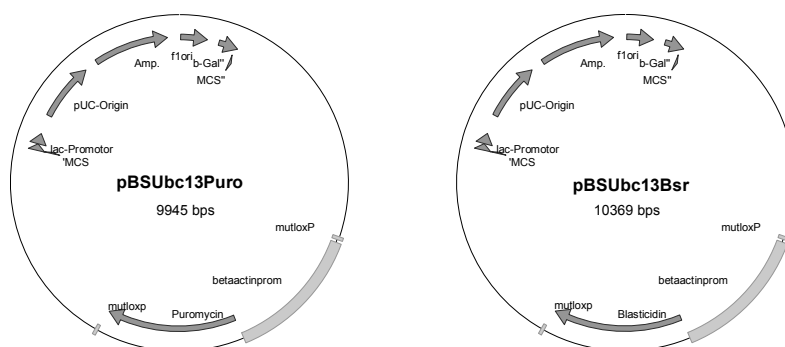


Abbildung 23: pBSUbc13Puro und pBSUbc13Bsr

#### pExpress & ploxgpt

Beide Vektoren wurden ursprünglich von H. Arakawa (HMGU, München) generiert. Der Vektor pExpress besitzt eine multiple Klonierungsstelle die durch einen *chicken*- $\beta$ -actin Promotor angetrieben wird. In diese MCS wurde die cDNA des Produktes von 13Ub8 und 13Ub9 hineinkloniert, so dass Zellen die mit diesem Vektor transfiziert werden, große Mengen an Ubc13 exprimieren können. Die Expressionskassette wurde anschließend über



die *SpeI* Schnittstellen in den ploxgpt Vektor kloniert, so dass *Ubc13* am 5' und 3' Ende durch loxP-Stellen flankiert und eine Resistenz gegen *gpt* (*guanosine phosphoribosyltransferase*) eingeführt wurde. Dadurch ist es möglich, über Aktivierung einer Cre-Rekombinase, die *Ubc13*-cDNA-Expressionskassette sowie die Resistenzkassette wieder aus dem Vektor zu entfernen.

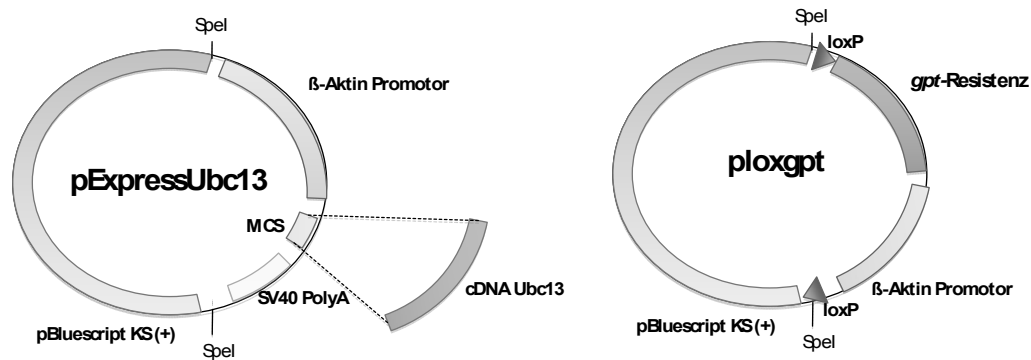


Abbildung 24: pExpressUbc13 und ploxgpt (verändert nach Arakawa et al, 2001)

### pBSRad18bsr

Der *Rad18-targeting* Vektor mit Blasticidinresistenzgen wurde für die Bestimmung der *targeting*-Rate verwendet, und ist von B. Jungnickel generiert und zur Verfügung gestellt worden. Der Vektor wurde schon detailliert beschrieben (Bachl et al., 2006).

## 6.1.9 Zelllinien

Tabelle 3: verwendete Zelllinien

### Hühner B-Zellen

DT40Cre1  
 DT40 *Ubc13*<sup>+/-</sup> Klon1 und2  
 DT40 *Ubc13*<sup>+/-R</sup> Klon1 und 2  
 DT40AID<sup>-/-</sup>  
 DT40Rad18<sup>-/-</sup>  
 DT40Ψ<sup>-/-</sup>AID<sup>R</sup>  
 DT40Ψ<sup>-</sup> AID<sup>R</sup> *Ubc13*<sup>+/-</sup>  
 DT40Ψ<sup>-</sup> AID<sup>R</sup> *Ubc13*<sup>+/-R</sup>  
 DT40Ψ<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>  
 DT40AID<sup>-/-</sup>AIDIRESGFP Klon 1 und 2  
 DT40AID<sup>-/-</sup>LUCIRESGFP

### Bezugsquelle

Jean-Marie Buerstedde, HMGU  
 selbst generiert  
 selbst generiert  
 Jean-Marie Buerstedde, HMGU  
 Berit Jungnickel, HMGU  
 Jean-Marie Buerstedde, HMGU  
 selbst generiert  
 selbst generiert  
 Jean-Marie Buerstedde, HMGU  
 I. Pfeil, HMGU  
 I. Pfeil, HMGU

**Humane B-Zelllinien**

BL100

Mutu<sup>-</sup>\*

DG75\*

BL70\*

Raji\*

BL60\*

P3HR1\*

HH514\*

Mutu III\*

BJAB

721\*

EREB 2-5\*

P493.6

Nalm6\*

**Andere Zelllinien**HEK 293 (*human, embryonic kidney cells*)HCT 116 p53<sup>wt</sup> (*human colon carcinoma cells*)HCT 116 p53<sup>-/-</sup>**Bezugsquelle**

B. Jungnickel, HMGU

J. Mergler, HMGU

B. Jungnickel, HMGU

B. Jungnickel, HMGU

J. Bachl, HMGU

B. Jungnickel, HMGU

B. Kempkes, HMGU

B. Kempkes, HMGU

J. Mergler, HMGU

B. Kempkes, HMGU

B. Kempkes, HMGU

B. Kempkes, HMGU

B. Kempkes, HMGU

J. Bachl, HMGU

**Bezugsquelle**

B. Kempkes, HMGU

D. Eick, HMGU

D. Eick, HMGU

\* Zellpellets dieser Zelllinien wurden für Western Blot Analysen von H. Scheller (HMGU, München) zur Verfügung gestellt

## 6.1.10 Oligonukleotide

**Tabelle 4: Oligonukleotide für PCR-Reaktionen**

Name	Nukleotidsequenz in 5'-3'Richtung
13Ub1	TCC AGC CTG GCC TTG GCT GCT TCC A
13Ub2	GTT TGA CAA ATT GCA TTC GTG AGA C
13Ub3	GAA TAA AAG CCC AGA CAT CTT CAG T
13Ub4	TGG AAG TCT GTG TCG TGA TGA TGG C
13Ub5	TTC CAC ACC ACT GCT ATA GGC AGG GAC ACC
13Ub8	GAA GCT AGC GCC ACC ATG GCC GGG CTG CCC C
13Ub9	CCC TCT CTC CAG AAC CGT CTT GTC CTC TTC ACT A
13Ub201	GTG TAA GAG GAC AAG CAA GAT AC
13Ub202	AGT TGG GCT AAA TGA CCT TCG
BS1	CGA TTG AAG AAC TCA TTC CAC TCA AAT ATA TAC CC
Pu4	CAG CGC CCG ACC GAA AGG AGC GCA
18Rad6	GAC GCC GGC TGT CAC TCG GGC CGG TC
λ1	TGG GAA ATA CTG GTG ATA GGT GGA T
λ2	GAG CGC AGG GAG TTA TTT GCA TAG
C2	CCT CCA TTT TTT GAC AGC ACT TAC CTG GAC AGC TG

## 6.1.11 Antikörper

**Tabelle 5: verwendete Antikörper**

<b>Name des Ak</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>aus</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-IgM <sub>FITC</sub>	1:50	Ziege	Bethyl Laboratories Inc.
anti-IgM <sub>PE</sub>	1:20	Ziege	Bethyl Laboratories Inc.
anti <sub>FITC</sub> <i>microbeads</i>	1:30		Miltenyi Biotech
anti-Ubc13	1:1000	Kaninchen	Abcam
anti-PCNA	1:1000	Maus	Abcam
anti-Tubulin	1:3000	Kaninchen	Sigma Aldrich
anti-AID <sub>5G9</sub>	1:5	Ratte	E. Kremmer, HMGU
anti-p21	1:3000	Maus	Sigma Aldrich
anti-p53	1:500	Kaninchen	Cell signalling
anti-rat IgG/IgM mit HRP	1:5000	Ziege	Jackson Imm. Research
anti-mouse IgG mit HRP	1:5000	Ziege	Promega
anti-rabbit IgG mit HRP	1:3000	Maus	Cell signalling

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Standardmethoden

Alle Standardmethoden molekularbiologischer Laboratorien, die hier nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei (Sambrook, 2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

### 6.2.2 Zellkulturbedingungen

Zellkulturarbeiten wurden stets unter einer Sterilbank (Haereus Christ Instruments, Düsseldorf) mit sterilen Glas-, und Plastikpipetten durchgeführt. DT40 Zellen wurden im Inkubator bei 41 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Humane Zelllinien sind bis auf die Temperatur von 37 °C unter denselben Bedingungen gewachsen. Soweit nicht anders beschrieben, fanden alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C mit 1200 rpm (ca. 200g) für 5 min in einer Varifuge statt (Haereus Christ Instruments, Düsseldorf).

DT40-Zellen wachsen einzeln in der Suspension und haben einen sehr schnellen Zellzyklus, so dass sie sich ungefähr zweimal am Tag teilen. Daher wurden sie jeden zweiten Tag mit frischem Hühner-Medium verdünnt und eine Zelldichte zwischen  $2 \times 10^4$  und  $1-2 \times 10^6$  eingehalten.

Die verwendeten Humanen Zelllinien wachsen etwas langsamer, so dass eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^6$  eingehalten worden ist. Semi-adherente HEK 293 und adherente HCT 116-Zellen wurden in Schalen kultiviert. Zudem mussten HCT 116-Zellen mit Trypsin (Gibco BRL, Schottland) behandelt werden, um diese vom Untergrund zu lösen.

#### **Kulturmedium für DT40-Zellen**

500 ml	RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Schottland)
10 %	FCS/FKS (Gibco BRL, Schottland)
1 %	Hühnerserum (Gibco BRL, Schottland)
100 µg/µl	Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco BRL, Schottland)
2 mM	Glutamin (200 mM) (Gibco BRL, Schottland)
1 mM	Natriumpyruvat (100 mM) (Gibco BRL, Schottland)
0,1 µM	β-Mercaptoethanol (1M) (Gibco BRL, Schottland)

#### **Kulturmedium für humane Zellen**

500 ml	RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Schottland)
10 %	FKS (PAA, Pasching, Österreich)
100 µg/µl	Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco BRL, Schottland)
2 mM	Glutamin (200 mM) (Gibco BRL, Schottland)
1 mM	Natriumpyruvat (100 mM) (Gibco BRL, Schottland)

### **6.2.3 Bestimmung der Zelldichte**

Um die Lebendzellzahl einer Zellkultur zu bestimmen, wurden Neubauer-Zählkammern eingesetzt. Die Zellen wurden in 4x16 Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Da die 16 Kleinquadrate und das Deckglas ein Gesamtvolumen von 0,1 µl einschließen, musste der berechnete Mittelwert mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert werden, um die Zelldichte pro ml zu erhalten.

### **6.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden in 1 bis 1,5 ml FKS mit 10 % DMSO bei minus 80 °C oder im flüssigen Stickstoff eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen, gewaschen und mit 10 ml frischem Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche transferiert und im Inkubator kultiviert.

## 6.2.5 Transfektion von DT40-Zellen

### 6.2.5.1 Vorbereitung der Zellen und der Plasmid-DNA

Damit sich die Plasmid-DNA stabil in das Genom von DT40 Zellen integrieren konnte, musste die zu transfizierende DNA zunächst linearisiert werden. Dazu wurden 50 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen 2 h bei 37 °C gespalten. Anschließend wurde die DNA mit 100 % EtOH und bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die DNA entsalzen. Dazu wurde sie bei 15.000 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend das Pellet mit 250 µl 70 % EtOH gewaschen. Danach wurde die DNA durch vortexen gut mit dem EtOH gemischt und für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der Überstand komplett abgenommen und der noch überschüssige Alkohol unter der Sterilbank verdampft. Alle Schritte der Transfektion sowie die Vorbereitungen wurden unter der Sterilbank durchgeführt (Haereus Christ Instruments, Düsseldorf). Die entsalzene DNA wurde in jeweils 300 µl sterilem PBS aufgenommen.

Als nächstes wurde die Zelldichte der zu transfizierenden Zellkultur bestimmt. Für eine Transfektion waren  $1 \times 10^7$  Zellen nötig, welche durch Zentrifugation pelletiert worden sind. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml sterilem PBS resuspendiert. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Zellen wieder in 500 µl PBS aufgenommen.

Diese wurden zusammen mit der linearisierten und entsalzene DNA auf Elektroporationsküvetten verteilt (0,4 cm Elektrodenabstand) und anschließend 10-15 min auf Eis inkubiert., so dass sich die DNA besser an die Zellen anlagern konnte.

### 6.2.5.2 Transfektion und Generierung von DT40-Einzelzellklonen

Direkt vor der Transfektion wurden die Proben gut miteinander gemischt und in den Elektroporator gestellt (Bio-Rad). Es wurde ein elektrischer Puls von 800 V und 50 µF gegeben, die Zellen anschließend in 10 ml frisches Hühner-Medium überführt und dann im Inkubator kultiviert.

Für die Generierung von Einzelzellklonen wurden jeweils 100 µl der transfizierten Zellen auf einer 96 Wellplatte verteilt und in den Inkubator gestellt. Nach 24 h wurden die Zellen durch Zugabe von 0,8 µg/ml Puromycin oder 5µg/ml Blastocidin oder 30 µg/ml Mucophenolsäure (gpt) selektioniert.

### 6.2.6 MACS-Separation

Bei dieser Methode werden bestimmte Zelltypen aus einem heterogenen Zellgemisch mit Hilfe von Magnetpartikeln und Antikörpern separiert (*Magnetic Activated Cell Separation*). Dazu werden Antikörper verwendet die gegen zellspezifische Oberflächenproteine gerichtet sind. Diese werden in einem weiteren Inkubationsschritt mit magnetischen Kleinpartikeln, den *microbeads* (Miltenyi), gekoppelt. Für alle Waschschrte wurde 2 x PBS; 0,5 % FCS verwendet.

Nach der Inkubation mit dem Ak wurde die Zellsuspension auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule aufgetragen, die durch einen umgebenden Dauermagneten magnetisiert worden war. Die mit *microbeads* beladenen Zellen blieben dadurch an der Säule haften, die nicht markierten Zellen konnten die Säule ungehindert passieren. Die gebundenen Zellen konnten nach der Entfernung aus der Dauermagnetvorrichtung problemlos von der Säule getrennt werden. Am Ende erhielt man zwei Fraktionen: den Durchlauf mit den unmarkierten Zellen und das Eluat mit den an *microbeads* gekoppelten, positiven Zellen. Für unsere Zwecke wurden Depletions-Säulen für eine saubere Abtrennung der unmarkierten Zellen (Depletion) und Separationssäulen (Separation) für eine Abtrennung der markierten Zellen eingesetzt.

Für die MACS-Separation wurden  $1 \times 10^7$ - $10^8$  Zellen benötigt. Während der gesamten Separation wurde auf Eis gearbeitet.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand komplett entfernt. Es wurde eine Probe von 20  $\mu$ l entnommen und das restliche Pellet wurde mit 10  $\mu$ l des Erstantikörpers (anti-IgM<sub>FITC</sub>) für 10 min auf Eis inkubiert. Überschüssige Ak wurden durch anschließende Waschschrte mit 3 ml PBS-FCS (0,5%) und durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde verworfen, und zum restlichen Volumen wurden 20  $\mu$ l *microbeads* (anti-IgM<sub>Microbeads</sub>) hinzugegeben. Die Suspension wurde dann für 20 min bei 4°C inkubiert und während dieser Zeit mehrmals geschüttelt. Es wurden 3 ml PBS-FCS (0,5%) hinzugegeben und eine zweite Probe von 20  $\mu$ l entnommen. Durch Zentrifugation wurden ungebundene Ak entfernt und das Pellet wieder mit den restlichen 100  $\mu$ l resuspendiert. Dann wurden die Zellen in 800  $\mu$ l PBS-FCS (0,5%) aufgenommen.

Die Säule wurde vor dem Auftragen der Zellsuspension in den Magneten (Miltenyi) gestellt und mit 3 ml PBS-FCS (0,5%) equilibriert. 800  $\mu$ l der Zellsuspension wurde in Portionen von je 200  $\mu$ l auf die Säule gegeben. Nachdem dieses Volumen durch die Säule gelaufen war, wurde die Säule mit zusätzlichen 2,5 ml PBS-FCS (0,5%) gewaschen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und daraus eine Probe von 20  $\mu$ l entnommen. Im Durchlauf sollten sich

alle unmarkierten IgM-negativen Zellen befinden, welche nicht an die Säule gebunden hatten. Zur Eluierung wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und 3 ml PBS-FCS (0,5%) auf die Säule gegeben. Durch Drücken des Säulen-Aufsatzes wurde das Lösen der IgM-positiven Zellen gefördert. Im Eluat sollten alle magnetisch-gekoppelten IgM-positiven Zellen sein, von welchen eine 20 µl Probe entnommen wurde. Die Zellen des Durchlaufs und des Eluates wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. 10 µl der jeweils entnommenen Proben wurden mit je 0,25 µl anti-IgM<sub>FITC</sub> gefärbt und mit Hilfe der FACS-Analyse (siehe 6.2.7) untersucht. Als Vergleich dazu wurden jeweils 10 µl der entnommenen Proben ohne Zugabe des Ak untersucht (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland).

#### 6.2.6.1 Ig-Genkonversionsassays und SHM-Assays im DT40-System

Vor der Durchführung von Ig-Genkonversionsassays mussten IgM<sup>neg</sup>-Zellpopulationen durch den Einsatz von MACS-Depletionssäulen generiert werden. MACS-Separationssäulen wurden hingegen für die Herstellung von IgM<sup>pos</sup> Zellpopulationen für SHM-Assays eingesetzt. Die so generierten Populationen wurden mit der entsprechenden Menge an Medium auf  $3,3 \times 10^4$  Zellen pro ml eingestellt und über zwei Verdünnungsschritte mit Medium auf  $3,3 \times 10^2$  Zellen pro ml verdünnt. Nach einer zusätzlichen 1 zu 10 Verdünnung wurden je 100 µl Zellen auf einer 96-Wellplatte verteilt, so dass pro Well ca. 3 Zellen ausplattiert worden sind. Nach 7-10 tägiger Inkubation wurden ca. 30 sichtbare EZK in je 1 ml Medium gepickt (24-Wellplatte) und kultiviert.

Die Rate an Ig-Genkonversion und SHM konnte nach Kultivierung der EZK für einige Wochen mit Hilfe einer FACS-Analyse (nächster Abschnitt) ermittelt werden. Ig-Genkonversionsassays wurden nach 6-8 Wochen auf diese Art analysiert, SHM-Assays konnten hingegen schon nach 2-4 Wochen ausgewertet werden. Über den gesamten Zeitraum wurden FACS-Analysen von EZK der jeweiligen parentalen Zelllinie durchgeführt, um den Prozess der Ig-Genkonversion und SHM zeitlich zu verfolgen (für eine schematische Darstellung siehe auch Abbildung 17A und Abbildung 22A).

#### 6.2.7 FACS-Analyse

Die Unterscheidung verschiedener Zellen erfolgte über die Markierung von Oberflächenmolekülen mit Hilfe monoklonaler Ak (mAk), die direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren, oder durch die Expression von GFP. Die Analyse

der gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS = *fluorescence activated cell scanner/sorter*). Dabei ist die gemessene Intensität des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter = FCS*) proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter = SSC*) ist von der Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zellen abhängig. Die Fluoreszenzintensitäten ergeben sich nach Anzahl der gebundenen Farbstoffmoleküle des Ak oder unterschiedlichen Expression von GFP.

Alle Zentrifugationen wurden für 3 min bei 4 °C und 500 rpm durchgeführt. Für Waschschrte wurde der FACS-Puffer aus 1 x PBS; 0,5 % BSA verwendet.

Zur FACS-Analyse wurden  $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert, gewaschen und zentrifugiert. Bei Verwendung von mAk wurde die entsprechende Menge des Ak zu dem Zellpellet gegeben und für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die nicht gebundenen Ak zu entfernen wurden die Proben dann mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden vor der FACS-Analyse in 100-200 µl PBS mit 1µg/ml Propidiumiodid (PBS/PI) aufgenommen.

### 6.2.8 PCNA-Ubiquitinierungsassays

Um die Modifikationen von PCNA nach Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Methoden zu untersuchen wurden PCNA-Ubiquitinierungsassays durchgeführt. Dazu wurden die zu behandelnden Zellen am Vortag auf 6-Wellplatten bzw. Petrischalen in dem entsprechenden Medium ausgesät.

DT40-Zellen	$2,5 \times 10^6$
HEK 293-Zellen	$1 \times 10^6$
HCT 116-Zellen (mit und ohne p53)	$1 \times 10^6$

Nach erfolgter Behandlung und Regeneration der Zellen wurden diese zu Zellpellets verarbeitet, daraus die Proteine extrahiert und diese mittels Western-Blot analysiert (siehe 6.4.4)

#### **UV-Behandlung**

Die UV-Behandlung erfolgte mit Hilfe eines UV-Stratalinkers 1800 (Stratagene, Texas, USA). Für semi-adherente Zelllinien (HEK 293) sowie adherente Zelllinien (HCT 116) wurde vor UV-Behandlung das Medium komplett abgenommen und die Zellen mit 3 ml PBS überschichtet. DT40-Zellen wurden dazu nach einem Zentrifugationsschritt in 1 ml



PBS aufgenommen. Folgende UV-Stärken wurden für die Bestrahlung eingesetzt: 20, 200, 500 und 1000 J/m<sup>2</sup>. Die Zellen wurden anschließend für 6 Stunden regeneriert.

### **HU-Behandlung (Hydroxyurea)**

Die HU-Behandlung (Bristol-Myers Squibb) erfolgte für je 5 Stunden in je 1 ml Kulturmedium. Es wurde in den Konzentrationen von 20 mM und 200 mM eingesetzt.

### **MMS-Behandlung (Methyl-Methansulfonat)**

Die MMS-Behandlung (Sigma Aldrich) erfolgte für 5 Stunden in je 8 ml Kulturmedium. Für die Vorverdünnungen wurde stets eine frisch angesetzte 1 % Stammlösung des Agens verwendet. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 0,0002 %, 0,001 %, 0,004%, 0,02 % und 0,1%.

### **IR-Behandlung (*irradiation*)**

Die IR-Behandlung erfolgte für einige Minuten in einer Gamma 40 <sup>137</sup>Cs-Bestrahlungsanlage (MDS-Nordion, Ottawa, Kanada). Die Zellen wurden dazu in den Zellkulturflaschen einer Bestrahlung von 800 Rad (8 Gy) ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen für einige Stunden im Inkubator regeneriert.

## **6.2.9 Proliferationsassay**

Der Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA SE bzw. kurz CFSE) wird stabil in die Zelle aufgenommen, jedoch halbiert sich dessen Konzentration innerhalb der Zelle mit jeder Teilung aufgrund der Verteilung des Farbstoffs auf die Tochterzellen. Es kommt somit zu einer regelmäßigen Halbierung des Fluoreszenzsignals mit jeder Zellteilung, was eine Beobachtung der Proliferation mit Hilfe einer FACS-Analyse erlaubt (Quah et al., 2007).

Es wurden je  $4 \times 10^6$  Zellen für die CFSE-Färbung und für die ungefärbte Kontrolle abgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 10 ml warmem PBS (41 °C) und erneute Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das so erhaltene Zellpellet in 2 ml CFDA-PBS-Lösung resuspendiert, wobei die CFDA-PBS-Lösung durch 1:10000 Verdünnung der 10 mM CFDA-Stammlösung in warmem PBS (41 °C) erhalten wurde. Zu den Zellen, die als ungefärbte Kontrolle im Assay mitgeführt werden sollten, erfolgte die Zugabe von 1 ml warmem PBS (41 °C). Die Inkubation erfolgte für 5 min im 41 °C Inkubator. Dann wurde die Färbereaktion durch

Zugabe von 10 ml kaltem Kulturmedium (4 °C) gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen dann in 10 ml warmem Kulturmedium (41 °C) aufgenommen und erneut für 30 min in den 41 °C Inkubator gestellt. Schließlich wurden sie wiederum zentrifugiert und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, so dass sie in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in Zellkulturflaschen kultiviert werden konnten. Es wurde mindestens 5 Stunden bis zur ersten FACS-Messung gewartet, die an den ersten 3 Tagen des Assays zweimalig im ca. 10 bis 12 Stunden Abstand und an den weiteren Tagen einmalig durchgeführt wurde. Die Dauer des Assays wurde durch das Erreichen der Eigenfluoreszenz der Zellen, welche durch eine ungefärbte Probe ermittelt wurde, bestimmt. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest. Anhand dieser Daten konnte die Proliferation in Abhängigkeit der Zeit graphisch dargestellt und die Generationszeit der Zellen berechnet werden (siehe 4.3.3).

## 6.2.10 Methylzellulose-Überlebensassay

### **Herstellung von 1,25 % Methylzellulose**

Es wurden 12,5 g Methylzellulosepulver abgewogen und in einer 1 Liter-Glasflasche sterilisiert. Zudem wurden 11,9 g DMEM und 2,44 g Natrium-Hydrogen-Carbonat in 500 ml Wasser aufgelöst und durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Unter ständigem Rühren wurde zu dem sterilen Methylzellulosepulver 220 ml 55°C-65°C heißes, steriles Wasser hinzugefügt. Beim Erreichen einer Temperatur des Gemisches von unter 55 °C, wurde die DMEM Lösung hinzugefügt und das Ganze über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag wurden unter ständigem Rühren 10 ml Natriumpyruvat, 10 ml Glutamin, 10 ml Penicillin/Streptomycin, 10 ml Hühnerserum, 100 ml FCS und 100 µl Mercaptoethanol hinzugegeben. Dann wurde 140 ml steriles Wasser hinzugefügt. Diese Lösung musste erneut über Nacht bei 4 °C gerührt werden. Vor dem Einsatz der fertigen Methylzellulose musste diese für 30 min. bei RT gerührt werden.

### **Durchführung des Methylzellulose-Überlebensassays mit Cisplatin**

Die Zellen, die für den Versuchsansatz benötigt wurden, sind am Vortag auf eine Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt worden. Zusätzlich konnten am Vortag die 6-Wellplatten mit je 5 ml Methylzellulose vorbereitet werden. In die Zwischenräume der Vertiefungen wurden zusätzlich 2 ml Wasser gegeben. Am Versuchstag wurden die Zellen auf eine Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und durch Nachzählen kontrolliert. Von dieser

Verdünnung wurde jeweils 1 ml in ein Well einer neuen 6-Wellplatte gegeben. Die Verdünnung musste stets gut gemischt werden (Vortex), um eine möglichst gleiche Zellzahl in jede Vertiefung zu pipettieren. Die erste Probe wurde als Kontrolle ohne Cisplatin, einem DNA-schädigenden Agenz, verwendet, in den verbleibenden Proben wurde eine ansteigende Konzentration von Cisplatin verwendet. Die Cisplatinkonzentration betrug 6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ , 24  $\mu\text{M}$  und 32  $\mu\text{M}$ . Jede Vertiefung wurde nach Zugabe des Agenz gut durchgemischt. Danach wurden die Zellen für 2 Stunden im Inkubator kultiviert. Nach diesem Schritt wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5ml Medium resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet in 10ml Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 100  $\mu\text{l}$  in die erste Vertiefung einer bereits am Vortag mit Methylcellulose vorbereiteten 6-Wellplatte pipettiert. In die zweite Vertiefung wurden 100  $\mu\text{l}$  der 1:10 Verdünnung und in die dritte Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  der 1:100 Verdünnung gegeben. Dieser Arbeitsschritt wurde zur Kontrolle gedoppelt. Die 6-Wellplatte wurde jeweils einmal kurz geschwenkt, um die Zellen zu verteilen. Danach wurden die Platten für 9-13 Tage im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Die Kolonien konnten dann ausgezählt und graphisch ausgewertet werden.

## 6.3 Techniken der DNA-Analyse

---

### 6.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Diese Art der Präparation wurde verwendet wenn besonders reine Plasmid-DNA aus einer geringen Menge an Zellen benötigt worden ist. Dazu wurde das Qiagen-Kit gemäß Herstellerangaben verwendet (QiaAmp DNA Mini Kit , Qiagen, Hilden).

### 6.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Jetstar-Kit laut Herstellerangaben verwendet (Jetstar-Kit, Genomed, Löhne).

### 6.3.3 Photometrische DNA-Quantifizierung

DNA-Konzentrationen wurden mit einem Photometer (Eppendorf, Köln) bestimmt. Dabei wurde das transmittierte Licht der Wellenlänge 260 nm gemessen ( $\text{OD}_{260}$ ). Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 ungefähr 50  $\mu\text{g/ml}$ . Daher kann man die DNA-Konzentration wie folgt berechnen:

DNA-Konzentration =  $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung}$ .

### 6.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA der Größe 0,5 kb-7kb wurden 1% Agarosegele und bei 0,2 kb-3 kb 1,5% Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1xTAE gelöst und gekocht. Um die DNA per UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Agarose 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt. Als Laufpuffer wurde bei der Elektrophorese 1xTAE benutzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 1/6 des Probenvolumens an Ladepuffer gemischt. Die DNA wurde im elektrischen Feld bei 100V in die einzelnen Fragmente aufgetrennt.

**1xTAE**

0,04 M Tris-Acetat

1 mM EDTA

**Agarosegel**

1-2 mg Agarose

100 ml 1xTAE

5 µl 1% Ethidiumbromid-Lösung

**Ladepuffer (6x)**

0,25 % Bromphenolblau

30 % Glycerol

### 6.3.5 Reinigung der DNA

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte über das QIA-quick-Kit laut Herstellerangaben (QUIAGEN GmbH, Hilden).

### 6.3.6 Direktisolierung von DNA

Diese Methode ermöglicht eine verlustfreie, aber dafür nicht sehr reine Präparation von genomischer DNA aus einer sehr geringen Anzahl an kultivierten Zellen. Dazu werden 50 µl Lysispuffer aus 10 mM Tris und 0,5 µg/µl Proteinase K auf  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen gegeben und 2,5 h bei 50 °C inkubiert. Danach wird die Proteinase K durch Inkubation für 10 min bei 95°C inaktiviert. Die gewonnene DNA konnte für PCR-Reaktionen genutzt werden.

### 6.3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die *Expand-long-template* Polymerase (Roche, Mannheim) wurde für die Amplifikation von sehr langen DNA-Sequenzen verwendet und diente dem PCR-Screening der gerichteten Integration in das DT40-Genom.

PCR-Reaktionen mit dieser Polymerase wurden unter folgender Temperaturabfolge mit meist 50 Zyklen in einer Biometra PCR-Maschine durchgeführt:

Start	95 °C	für 5 min
Zyklische Denaturierung	95 °C	für 50 sec
Zyklische Anlagerung	66,5 °C	für 50 sec
Zyklische Verlängerung	72 °C	für 7 min
Finale Verlängerung	72 °C	für 10 min

Die Taq-DNA-Polymerase wurde in allen PCR-Reaktionen eingesetzt, die keine zusätzlichen Anforderungen an die Polymerase gestellt haben. Diese PCR-Reaktionen wurden meist mit 35 Zyklen unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Start	95 °C	für 2 min
Zyklische Denaturierung	94 °C	für 45 sec
Zyklische Anlagerung	63 °C	für 30 sec
Zyklische Verlängerung	72 °C	für 1 min
Finale Verlängerung	72 °C	für 10 min

### 6.3.8 Klonierungstechnik

#### 6.3.8.1 Ubc13-Überexpressionsvektor und Ubc13-*targeting* Vektoren

Der cDNA Überexpressionsvektor für Ubc13 und die beiden Ubc13 *targeting*-Vektoren wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit kloniert und sind bereits detailliert beschrieben worden (I. Ertongur, Diplomarbeit).

#### 6.3.8.2 pGEMT-Klonierung des VJ-Bereichs von DT40-EZK

Per PCR wurde mit dem Primerpaar C<sub>2</sub>-λ<sub>1</sub> der VJ-Bereich aus der zuvor aufgereinigten DNA einzelner DT40-Klone des Ig-Genkonversions- sowie SHM-Assays amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend per QIAquick-System aus dem Agarosegel aufgereinigt. Nach anschließender DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die entsprechende Menge an DNA mit dem Vektor pGEM-T (Promega) laut Herstellerangaben über Nacht mit der T4-Ligase ligiert und per Hitzeschock in Bakterien transformiert .

### 6.3.9 Southern-Blot

Die Fragmente der genomischen DNA wurden nach Spaltung mit *Pst*I (siehe 4.3.1 und 4.3.4) in einem 0,8 % Agarosegel, das mit EtBr versetzt war, über mehrere Stunden bei 180 V aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Auftrennung unter UV-Licht neben einem fluoreszierenden Lineal photographiert, um später die Größen der einzelnen Fragmente abschätzen zu können.

Vor dem Transfer wurde das Gel in 0,25 M HCl für etwa 15 min geschüttelt, um die großen DNA-Fragmente in kleinere, besser zu transferierende Stücke zu spalten. Danach wurde das Gel durch 1 h Schütteln im Transferpuffer neutralisiert. Die DNA wurde mittels des Transferpuffers durch Kapillarkräfte auf eine Nitrozellulose-Membran (NEN-GeneScreen Plus, Boston, MA, USA) transferiert. Der Transfer wurde über Nacht bei RT durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2 x SSC oder 0,5 M Tris HCl (pH 7,5) für 5 min neutralisiert. Die DNA wurde durch anschließendes Backen bei 80 °C auf der Membran fixiert.

#### **20 x SSC**

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat

#### **Transferpuffer (TS)**

0,4 M NaOH

0,6 M NaCl

#### **Hybridisierung**

Die getrocknete Membran wurde mit 2 x SSC befeuchtet und dann eingerollt bei 66,5 °C mit 25 ml Prähybridisierungspuffer für mindestens 4 h in einem Hybridisierungssofen (Habaid, Heidelberg) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken.

Nach dem Blocken der Membran wurde dem Puffer die radioaktiv markierte Sonde zugesetzt. Die Hybridisierung der Sonde fand über Nacht bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen statt (Habaid, Heidelberg).

Die überschüssige Sonde wurde durch Waschstschritte bei 65 °C entfernt. Je nach Sonde wurde 5-20 min gewaschen. Anschließend wurde der Blot luftdicht eingeschweißt. Zur Verdeutlichung der radioaktiven Banden wurde die Membran in BioMax-Kassetten auf Kodak-BioMax-Filme gelegt und der Film bei -80 °C belichtet. Die Belichtungszeit reichte von mehreren Stunden bis zu einigen Tagen. Die Filme wurden in einer Entwicklungsmaschine entwickelt (CAVOMAT, Christiansen GmbH).

**Prähybridisierungspuffer**

1 M NaCl  
50 mM Tris, pH 7,5  
10 % Dextransulfat  
1 % SDS  
250 µg/ml sonifiziertes Lachssperma

**Waschpuffer**

2 x SSC  
0,1 % SDS oder höher

**Herstellung radioaktiver Sonden**

Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde über PCR mit den Primern 13Ub201 und 13Ub202 und umfasste ein ca. 300 bp großes Fragment am 3' Ende von *Ubc13*. Zur radioaktiven Markierung wurden etwa 25 ng der DNA-Sonde verwendet, die in 45 µl H<sub>2</sub>O gelöst war. Die DNA wurde für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und nach 5 min Abkühlung auf Eis mit einem Aliquot rediPrime<sup>TM</sup> II (Amersham Pharmacia, Braunschweig) gemischt. Zuletzt wurde mit <sup>32</sup>P radioaktiv markiertes dCTP (50µCi) zugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Mit Hilfe einer Sephadex-Säule (Microspin S-200 HR, Amersham Pharmacia, Braunschweig) und 1 min Zentrifugation bei 3000 rpm wurde die radioaktive Sonde von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Um die Sonde zu denaturieren wurde sie dann gekocht und es wurden 30.000.000 dpm/min zu der Prähybridisierungslösung zugegeben. Mit diesem Gemisch wurde die Membran bei 65 °C inkubiert.

**6.3.10 DNA-Sequenzierungen**

Die DNA-Sequenzierung einzelner Bakterien-Subklone nach Klonierung des VJ-Bereichs in den pGEMT-Vektor (siehe 6.3.8.2) erfolgte beim Sequenzierungsservice der LMU in München. Dazu wurde eine Abwandlung der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger, die *ABI BigDye Kit* Version 3.1, auf einem Kapillarsequencer (Applied Biosystems) und der Primer  $\lambda_2$  verwendet.

**6.4 Proteinbiochemische Methoden**

---

**6.4.1 Präparation von Proteinen aus Zellen**

Für die Isolierung der Proteine wurden  $3-6 \times 10^6$  Zellen bei 1200 rpm für 5 Minuten sedimentiert und mit PBS gewaschen. Zu diesem Zellpellet wurden 40-60 µl heißer 2x Laemmli Probenpuffer zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Der Laemmli Probenpuffer enthielt kein BPB und kein DTT, da diese beiden Substanzen bei der späteren

Proteinquantifizierung stören würden. Um die Degradation der Proteine durch Proteasen zu minimieren, wurden Proteaseinhibitoren zugegeben (Protease Inhibitor Complete Mini Tabletten, Roche). Die Proben wurden 5 min bei 100 °C erhitzt und anschließend gut gemischt. Die Lysate wurden für weitere Experimente verwendet bzw. bei -20 °C eingefroren.

### **2x Laemmli Probenpuffer**

4 % SDS ; 20 % Glycerin; 250 mM Tris

## **6.4.2 Proteinquantifizierung**

Proteinmengen wurden mit Hilfe des DC Protein Assay (Bio-Rad) photometrisch bestimmt. Dieser ist mit dem Laemmli-Probenpuffer, der 2,5 % SDS enthält, kompatibel. Die Proteinkonzentration der Proben wurde wie vom Hersteller empfohlen, unter Benutzung des mitgelieferten Proteinkonzentrationsstandards, bestimmt (DC Protein Assay, Bio-Rad).

## **6.4.3 SDS-PAA-Gelelektrophorese**

Bei dieser Methode wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt, das 0,1 % SDS enthielt. Zur Vorbereitung der isolierten Zelllysate wurde zu jeder Probe jeweils 1/10 des Volumens 1 M DTT und 1/10 des Volumens Bromphenolblau-Lösung gegeben und dieses Gemisch dann 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Durch das Aufkochen wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung wurde durch das Detergenz SDS verhindert. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch DTT reduziert.

Das Polyacrylamidgel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Das verwendete 10 % Trenngel ermöglichte eine Auftrennung der Proteine im Bereich zwischen 14 kDa und 68 kDa. Die vorbereiteten Proben wurden auf das mit Laemmli Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Bio-Rad Vorrichtung bei 100 V durchgeführt.

### **Trenngel 10%**

4,0 ml	H <sub>2</sub> O
3,3 ml	30 % Acrylamid (rotiphorese Gel 30, Roth)
2,5 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
100 µl	10 % SDS
100 µl	10 % APS



4,0 µl	10 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	
<b>Sammelgel</b>		<b>10 x Laemmli Laufpuffer</b>
3,4 ml	H <sub>2</sub> O	30,3 g TRIS Base
840 µl	30 % Acrylamid	144,2 g Glycin
625 µl	1 M Tris, pH 6,8	10 g SDS oder 100 ml 10 % SDS
50 µl	10 % SDS	auf 1l mit Wasser auffüllen
50 µl	10 % APS	
3,0 µl	10 % TEMED	

#### 6.4.4 Western-Blot

Mit dem Western-Blot werden Proteingemische, die durch Elektrophorese aufgetrennt worden sind, mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wird das Muster der einzelnen Proteinbanden zunächst auf eine proteinbindende PVDF-Membran übertragen. Das elektrische Feld stand dabei senkrecht zur vorherigen Trennrichtung. Es wurde ein so genannter „Nass-Blot“ in einem Bio-Rad-Tank durchgeführt, bei dem die gesamte Blotvorrichtung mit Blotpuffer überdeckt ist. Vor dem Blotvorgang wurde die Membran (Hybond, Amersham) in Methanol angefeuchtet. Anschließend wurde die Membran in Wasser gewaschen und 5 min in Blotpuffer equilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls 5 min in Blotpuffer equilibriert und dann auf drei, mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere platziert. Die PVDF-Membran wurde auf das Gel gelegt und mit drei weiteren, in Blotpuffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Nach dem Entfernen von Luftblasen wurde dieser Aufbau zwischen Anode und Kathode so angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wanderten. Die Transferkammer wurde dann mit Blotpuffer gefüllt und unter Rühren für 1 h ein elektrisches Feld mit 100 V angelegt. Anschließend wurde die Membran in PBS gewaschen und für 5 min reversibel mit Ponceau S gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Für weitere Analysen wurde die Membran in Wasser gewaschen bis die Ponceau-Färbung entfernt war und bei 4 °C aufbewahrt.

<b>10 x Blotpuffer</b> (ohne Methanol)	<b>1 x Blotpuffer</b>	<b>10 x Ponceau S</b>
30,3 g TRIS Base	100 ml 10 x Blotpuffer	2 % Ponceau S
144,2 g Glycin	700 ml H <sub>2</sub> O	30% Trichloressigsäure
auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen	200 ml Methanol	30 % Sulfosalicylsäure

### 6.4.5 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Mit der darauf folgenden Immunodetektion konnten die immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dies erfolgte über zwei Antikörper. Der erste Ak hat spezifisch an das Protein gebunden, der Zweitantikörper war gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet und an *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt. Um unspezifische Bindungen der Ak zu minimieren, wurde die Membran zunächst mit einer 5 % Milchpulver-PBS-Lösung für 30-60 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper in einer 1 %-Milchpulver-Lösung über Nacht inkubiert. Nach Waschschritten mit PBS wurde die Membran mit dem ebenfalls in 1 % Milch gelösten Zweitantikörper für 1-3 Stunden inkubiert. Nicht gebundene Zweitantikörper wurden dabei erneut im Anschluss durch Waschen mit PBS entfernt. Die Chemolumineszenz-Reaktion die durch HRP und das ECL-Detektionsreagenz (Amersham) angeregt wurde, konnte mit Hilfe eines lichtsensitiven Filmes detektiert werden (Hyperfilm ECL, Amersham). Der Film wurde anschließend entwickelt (CAVOMAT, Christiansen GmbH). Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen sind unter Tabelle 5, Abschnitt 6.1.11 aufgelistet.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

---

μF	Microfarad
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillinresistenzgen
AP-Stelle	Apurinische bzw. Apyrimidinische Stelle
BCR	<i>B cell receptor</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BIR	Bruch induzierte Replikation
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bsr	Blasticidin
C	Cytosin
C-Region	<i>constant region</i>
CSR	<i>class switch recombination</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dox	Doxycylin
dsDNA	Doppelsträngige DNA
D-Segment	<i>Diversity</i> -Segment des V-Gens
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	<i>et alterae, und andere</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EZK	Einzelzellklone
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FCS/FKS	<i>Fetal calf serum/</i> fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GC	<i>gene conversion</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

---

gpt	<i>guanosine phosphoribosyltransferase</i> (Mycophenolsäure)
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
Ig	Immunglobulin
IgL	leichte Ig-Kette
IgH	schwere Ig-Kette
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle
J-Segment	<i>joining</i> -Segment des V-Gens
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
MACS	<i>magnetic associated cell sorting</i>
MCS	<i>multiple cloning side</i>
min	Minute
MMR	<i>mismatch repair</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NFκB	<i>nuclear factor-κB</i>
NHEJ	<i>non homologous endjoining</i>
nm	Nanometer
N-Nukleotide	Nicht matrizen-kodierte Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P-Nukleotide	Palindromische Nukleotide
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PRR	<i>postreplication repair</i>
puro	Puromycin
Rag	Rekombinationsaktivierende Gene
RNA	<i>ribonuclein acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
S-Region	Schalterregion
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDSA	<i>synthesis dependent strand annealing</i>
sec	Sekunde
SHM	Somatische Hypermutation
SSA	<i>single strand annealing</i>
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>

---

T	Thymin
TCR	<i>T cell receptor</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TLS	Translasionssynthese
U	Uracil
UNG	Uracil-Glykosylase
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V-Segment	<i>variable</i> -Segment des V-Gens
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Übersicht über die berechneten Proliferationsgeschwindigkeiten .....	50
Tabelle 2: <i>Targeting</i> -Rate des Rad18-Vektors in DT40Cre1 sowie Ubc13 <sup>+/-</sup> Klon 1 und Klon 2 .....	57
Tabelle 3: verwendete Zelllinien.....	81
Tabelle 4: Oligonukleotide für PCR-Reaktionen.....	82
Tabelle 5: verwendete Antikörper.....	83

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Schema der Nicht-homologen Endverknüpfung freier DNA-Enden	13
Abbildung 2: Schema der konservativen und nicht konservativen HR	14
Abbildung 3: Schema des Rad6-Weges in Vertebraten	16
Abbildung 4: Mechanismen zur Generierung der Lymphozyten-Ag Rezeptoren	21
Abbildung 5: Modell zur Reparatur AID-induzierter Läsionen	23
Abbildung 6: Etablierung von PCNA-Ubiquitinierungsassays in HEK 293-Zellen	28
Abbildung 7: Etablierung von PCNA-Ubiquitinierungsassays in DT40-Zellen	29
Abbildung 8: Ubiquitinierungsassays in DT40Rad18 <sup>+/+</sup> und DT40Rad18 <sup>-/-</sup> -Zellen	31
Abbildung 9: Ko-Immunopräzipitation in DT40Cre1-Zellen	32
Abbildung 10: Ubiquitinierungsassays in DT40Cre1, Rad18 <sup>-/-</sup> , PCNA <sup>Par</sup> und PCNA <sup>K164R</sup>	33
Abbildung 11: MMS-Behandlung von verschiedenen, humanen B-Zelllinien	36
Abbildung 12: Western Blot Analyse von IR-sowie UV-bestrahlten HCT 116-Zellen	37
Abbildung 13: Western Blot Analyse von DT40Cre1-Zellen nach Behandlung mit MMS	39
Abbildung 14: AID-Überexpression in verschiedenen DT40-Einzelzellklonen	40
Abbildung 15: Western Blot Analyse verschiedener Burkitt-Zelllinien	41
Abbildung 16. Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in DT40Cre1-Zellen	44
Abbildung 17: Ig-Genkonversionsassay mit dem Zellset <sup>Ig-GC</sup>	46
Abbildung 18: Sequenzanalyse des Bereichs CDR1 der EZK aus dem Ig-GC Assay	48
Abbildung 19: Proliferationsassay von DT40Cre1, Ubc13 <sup>+/-</sup> Klon 1 und Klon 2 sowie Ubc13 <sup>+/-R</sup> Klon 1 und Klon2	50
Abbildung 20: MCSA-Methylzelluloseassay	51
Abbildung 21: Inaktivierung des ersten Ubc13-Allels in DT40Ψ <sup>-</sup> AID <sup>R</sup> -Zellen	53
Abbildung 22: Somatischer Hypermutationsassay mit verschiedenen DT40-Zellen	55
Abbildung 23: pBSUbc13Puro und pBSUbc13Bsr	80
Abbildung 24: pExpressUbc13 und plogxpt	81

## 7.4 Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Betreuerin und Doktormutter PD Dr. Berit Jungnickel, die mich auch schon während der Diplomarbeit immer unterstützt hat und auch während meiner Doktorarbeit stets mit Rat und Tat an meiner Seite stand.

Ich danke zudem Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp dafür, dass sie zunächst die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat und mir zusammen mit Dr. Ulla Strobl sowie Prof. Dr. Dirk Eick bei zahlreichen Vorträgen wissenschaftlichen Input gegeben hat.

Ich danke allen alten und neuen Mitgliedern der Jungnickel-Arbeitsgruppe für das kollegiale und freundschaftliche Arbeitsklima, das leckere gemeinsame Essen, sowie die gemeinsamen fachlichen Diskussionen.

Ich bedanke mich für die fleißigen Hände von Sandra K., André, Sandra W., Kerstin und Sabine ohne deren Hilfe einige Experimente definitiv nicht durchführbar gewesen wären!

An Maren und Stephi geht ein riesen großer Dank für die Etablierung von etlichen Methoden in unserer Arbeitsgruppe sowie die tolle Einarbeitung, herzliche Aufnahme in die Gruppe und Eure Freundschaft. Als ihr nicht mehr da ward, habt ihr eine große Lücke hinterlassen...

Ich danke Sushmita und Hanna für die moralische Unterstützung, die vor allem in der Endphase der Doktorarbeit geholfen hat! Meinem Laborehepartner Hanna nochmals ein Extradank für den Zusammenhalt, die Freundschaft, schönen Urlaube sowie den fachlichen Input in schwierigen Situationen.

Ein großer Dank fürs Korrekturlesen geht an Samantha, Kerstin, Torsten und Hanna.

Außerdem bin ich sehr froh, dass ich in der KMOLBI so viele neue, gute Freunde finden konnte, die zudem beim Lunchclub fürs leibliche Wohl gesorgt haben.

Natürlich haben auch meine langjährigen Freunde Martini, Torschti und Natalie sehr viel dazu beigetragen, dass ich die Achterbahnfahrt einer Doktorarbeit erfolgreich überstanden habe! Danke für Eure Freundschaft und die lieben Worte in den letzten 4 Jahren!

Den Harmunichs und Junebugs danke ich für die moralische und seelische Unterstützung in musikalischer Form, die mich vor allem in den panischen Momenten daran erinnert hat, dass das Leben nicht nur aus missglückten Experimenten besteht!

Ich bedanke mich vor allem bei meiner türkischen sowie deutschen Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren-und für die immer wieder aufmunternden Worte...

Als letztes ein Riesendank an meinen Verlobten Torsten, ohne dessen Unterstützung und Hilfe ich diese Doktorarbeit nie geschafft hätte. Deine Taten, Worte und Glaube an meine Fähigkeiten haben mich immer wieder darin bestärkt weiterzumachen...Gemeinsam können wir alle Herausforderungen des Lebens meistern! Seni çok seviyorum!



## 7.5 Ehrenwörtliche Versicherung

---

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, den 29 Mai 2009

Işın Ertongur

## 7.6 Erklärung

---

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 29 Mai 2009

Işın Ertongur

## 7.7 Lebenslauf

---

### **Persönliche Daten**

Sabahat Işın Ertongur  
geboren am 19.03.1980 in Ankara (Türkei)  
deutsche Staatsangehörigkeit

---

### **Ausbildung**

1986-1990	Grundschule in Ottobrunn bei München
1990-1999	Gymnasium Neubiberg bei München
1999-2005	Biologie-Studium an der TU – München Abschluss als Diplom-Biologin
2004/2005	Diplomarbeit am Institut für „Klinische Molekular- biologie und Tumorgenetik“ am Helmholtz Zentrum München (ehemals gsf) Thema: „Beeinflussung der homologen Rekombination in DT40-Zellen durch den Rad-6 Weg“
seit 08/2005	Doktorarbeit am Institut für „Klinische Molekular- biologie und Tumorgenetik“ am Helmholtz Zentrum München Thema: „Funktionen und Regulation der PCNA- Ubiquitinierung in Vertebraten“

---

### **Auslandsaufenthalt**

2003/2004	Biochemie-Praktikum in Frankreich an der Universität ENS-Lyon
-----------	--

---

## 7.8 Literaturverzeichnis

---

Andersen, P. L., Zhou, H., Pastushok, L., Moraes, T., McKenna, S., Ziola, B., Ellison, M. J., Dixit, V. M., and Xiao, W. (2005). Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol* 170, 745-755.

Arakawa, H. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4, e366.

Arakawa, H., and Buerstedde, J. M. (2004). Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. *Dev Dyn* 229, 458-464.

Arakawa, H., Hauschild, J., and Buerstedde, J. M. (2002). Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* 295, 1301-1306.

Arakawa, H., Lodygin, D., and Buerstedde, J. M. (2001). Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol* 1, 7.

Arakawa, H., Moldovan, G. L., Saribasak, H., Saribasak, N. N., Jentsch, S., and Buerstedde, J. M. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4, e366.

Arakawa, H., Saribasak, H., and Buerstedde, J. M. (2004). Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol* 2, E179.

Avkin, S., Sevilya, Z., Toubé, L., Geacintov, N., Chaney, S. G., Oren, M., and Livneh, Z. (2006). p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol Cell* 22, 407-413.

Bachl, J., Ertongur, I., and Jungnickel, B. (2006). Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12081-12086.

Bae, S. I., Zhao, R., and Snapka, R. M. (2008). PCNA damage caused by antineoplastic drugs. *Biochem Pharmacol* 76, 1653-1668.

Bassing, C. H., Swat, W., and Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55.

Batty, D., Rasic'Otrin, V., Levine, A. S., and Wood, R. D. (2000). Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites. *J Mol Biol* 300, 275-290.

Belgi, G., and Friedmann, P. S. (2002). Traditional therapies: glucocorticoids, azathioprine, methotrexate, hydroxyurea. *Clin Exp Dermatol* 27, 546-554.

Bergink, S., and Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461-467.

- Berneburg, M., and Lehmann, A. R. (2001). Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet* 43, 71-102.
- Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S., and Buerstedde, J. M. (1997). Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54<sup>-/-</sup> mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* 89, 185-193.
- Bi, X., Barkley, L. R., Slater, D. M., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Ohmori, H., and Vaziri, C. (2006). Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol* 26, 3527-3540.
- Bienko, M., Green, C. M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A. R., *et al.* (2005). Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* 310, 1821-1824.
- Bootsma, D., Weeda, G., Vermeulen, W., van Vuuren, H., Troelstra, C., van der Spek, P., and Hoeijmakers, J. (1995). Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347, 75-81.
- Branzei, D., Seki, M., and Enomoto, T. (2004). Rad18/Rad5/Mms2-mediated polyubiquitination of PCNA is implicated in replication completion during replication stress. *Genes Cells* 9, 1031-1042.
- Broomfield, S., Hryciw, T., and Xiao, W. (2001). DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 486, 167-184.
- Buerstedde, J. M., Reynaud, C. A., Humphries, E. H., Olson, W., Ewert, D. L., and Weill, J. C. (1990). Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO J* 9, 921-927.
- Buerstedde, J. M., and Takeda, S. (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67, 179-188.
- Burma, S., Chen, B. P., and Chen, D. J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5, 1042-1048.
- Cario, G., Stadt, U. Z., Reiter, A., Welte, K., and Sykora, K. W. (2000). Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *Br J Haematol* 110, 537-546.
- Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X. F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (1998). Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *Embo J* 17, 2404-2411.
- Chiu, R. K., Brun, J., Ramaekers, C., Theys, J., Weng, L., Lambin, P., Gray, D. A., and Wouters, B. G. (2006). Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet* 2, e116.
- Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H., and Menck, C. F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85, 1083-1099.

Cox, B. S., and Parry, J. M. (1968). The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet light-sensitive mutants in yeast. *Mutat Res* 6, 37-55.

de Laat, W. L., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13, 768-785.

Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J. C., and Reynaud, C. A. (2007). DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* 204, 17-23.

Di Noia, J., and Neuberger, M. S. (2002). Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature* 419, 43-48.

Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. (2004). Immunoglobulin gene conversion in chicken DT40 cells largely proceeds through an abasic site intermediate generated by excision of the uracil produced by AID-mediated deoxycytidine deamination. *Eur J Immunol* 34, 504-508.

Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76, 1-22.

Diaz, M., and Flajnik, M. F. (1998). Evolution of somatic hypermutation and gene conversion in adaptive immunity. *Immunol Rev* 162, 13-24.

Dixit, V., and Mak, T. W. (2002). NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid. *Cell* 111, 615-619.

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., *et al.* (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136, 435-446.

Dronkert, M. L., and Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486, 217-247.

Eddins, M. J., Carlile, C. M., Gomez, K. M., Pickart, C. M., and Wolberger, C. (2006). Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat Struct Mol Biol* 13, 915-920.

Farrington, S. M., Tenesa, A., Barnetson, R., Wiltshire, A., Prendergast, J., Porteous, M., Campbell, H., and Dunlop, M. G. (2005). Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet* 77, 112-119.

Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

Fortini, P., and Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6, 398-409.

Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V., and Dogliotti, E. (2003). The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85, 1053-1071.

Frampton, J., Irmisch, A., Green, C. M., Neiss, A., Trickey, M., Ulrich, H. D., Furuya, K., Watts, F. Z., Carr, A. M., and Lehmann, A. R. (2006). Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 17, 2976-2985.

Friedberg, E. C. (2008). A brief history of the DNA repair field. *Cell Res* 18, 3-7.

Fukushima, T., Matsuzawa, S., Kress, C. L., Bruey, J. M., Krajewska, M., Lefebvre, S., Zapata, J. M., Ronai, Z., and Reed, J. C. (2007). Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a critical component of TNF receptor-associated factor (TRAF)-mediated inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6371-6376.

Gangavarapu, V. (2007). Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 7758-7764.

Goldberg, A. L., Cascio, P., Saric, T., and Rock, K. L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39, 147-164.

Goodman, M. F., and Tippin, B. (2000). The expanding polymerase universe. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 101-109.

Goossens, T., Klein, U., and Koppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2463-2468.

Guo, C., Tang, T. S., Bienko, M., Parker, J. L., Bielen, A. B., Sonoda, E., Takeda, S., Ulrich, H. D., Dikic, I., and Friedberg, E. C. (2006). Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Mol Cell Biol* 26, 8892-8900.

Haracska, L., Unk, I., Prakash, L., and Prakash, S. (2006). Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6477-6482.

Harfe, B. D., and Jinks-Robertson, S. (2000). Mismatch repair proteins and mitotic genome stability. *Mutat Res* 451, 151-167.

Harris, R. S., Sale, J. E., Petersen-Mahrt, S. K., and Neuberger, M. S. (2002). AID is essential for immunoglobulin V gene conversion in a cultured B cell line. *Curr Biol* 12, 435-438.

Hatanaka, A., Yamazoe, M., Sale, J. E., Takata, M., Yamamoto, K., Kitao, H., Sonoda, E., Kikuchi, K., Yonetani, Y., and Takeda, S. (2005). Similar effects of Brca2 truncation and Rad51 paralog deficiency on immunoglobulin V gene diversification in DT40 cells support an early role for Rad51 paralogs in homologous recombination. *Mol Cell Biol* 25, 1124-1134.

- Hazra, T. K., Das, A., Das, S., Choudhury, S., Kow, Y. W., and Roy, R. (2007). Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)* 6, 470-480.
- Hefferin, M. L., and Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4, 639-648.
- Helleday, T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res* 532, 103-115.
- Hemann, M. T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J. A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J. L., Tansey, W. P., and Lowe, S. W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807-811.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-653.
- Honjo, T., Muramatsu, M., and Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20, 659-668.
- Hsieh, P. (2001). Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res* 486, 71-87.
- Huang, H., Kahana, A., Gottschling, D. E., Prakash, L., and Liebman, S. W. (1997). The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 6693-6699.
- Huang, J., Huen, M. S., Kim, H., Leung, C. C., Glover, J. N., Yu, X., and Chen, J. (2009). RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 11, 592-603.
- Imai, K., Slupphaug, G., Lee, W. I., Revy, P., Nonoyama, S., Catalan, N., Yel, L., Forveille, M., Kavli, B., Krokan, H. E., *et al.* (2003). Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 4, 1023-1028.
- Janeway, C. M., K.; Travers, P.;Walport, M. (2008). *Immunobiology*, seventh edition: Garland Science).
- Jentsch, S., McGrath, J. P., and Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 329, 131-134.



- Jiricny, J. (1998). Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res* 409, 107-121.
- Johnson, R. E., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science* 283, 1001-1004.
- Jordan, P., and Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57, 1229-1235.
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H., and van Gent, D. C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* 8, 483-489.
- Kannouche, P. L., and Lehmann, A. R. (2004). Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* 3, 1011-1013.
- Kannouche, P. L., Wing, J., and Lehmann, A. R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 14, 491-500.
- Kim, S., Humphries, E. H., Tjoelker, L., Carlson, L., and Thompson, C. B. (1990). Ongoing diversification of the rearranged immunoglobulin light-chain gene in a bursal lymphoma cell line. *Mol Cell Biol* 10, 3224-3231.
- Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A., Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A., and Brown, J. M. (1995). DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267, 1178-1183.
- Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., *et al.* (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318, 1637-1640.
- Kolodner, R. D., and Marsischky, G. T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9, 89-96.
- Kunkel, T. A. (1995). DNA-mismatch repair. The intricacies of eukaryotic spell-checking. *Curr Biol* 5, 1091-1094.
- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10962-10966.
- Laine, A., Topisirovic, I., Zhai, D., Reed, J. C., Borden, K. L., and Ronai, Z. (2006). Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol* 26, 8901-8913.
- Langerak, P., Nygren, A. O., Krijger, P. H., van den Berk, P. C., and Jacobs, H. (2007). A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J Exp Med* 204, 1989-1998.
- Lawrence, C. (1994). The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays* 16, 253-258.

- Leach, C. A., and Michael, W. M. (2005). Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol* 171, 947-954.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lindahl, T., and Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905.
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, C. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H., and Schatz, D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Livneh, Z. (2006). Keeping mammalian mutation load in check: regulation of the activity of error-prone DNA polymerases by p53 and p21. *Cell Cycle* 5, 1918-1922.
- Manis, J. P., Tian, M., and Alt, F. W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 23, 31-39.
- Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S., and Hanaoka, F. (1999). Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J* 18, 3491-3501.
- McCormack, W. T., and Thompson, C. B. (1990). Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light-chain gene. *Adv Immunol* 48, 41-67.
- McKenna, S., Moraes, T., Pastushok, L., Ptak, C., Xiao, W., Spyropoulos, L., and Ellison, M. J. (2003). An NMR-based model of the ubiquitin-bound human ubiquitin conjugation complex Mms2.Ubc13. The structural basis for lysine 63 chain catalysis. *J Biol Chem* 278, 13151-13158.
- Moraes, T. F., Edwards, R. A., McKenna, S., Pastushok, L., Xiao, W., Glover, J. N., and Ellison, M. J. (2001). Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nat Struct Biol* 8, 669-673.
- Motegi, A., Liaw, H. J., Lee, K. Y., Roest, H. P., Maas, A., Wu, X., Moinova, H., Markowitz, S. D., Ding, H., Hoeijmakers, J. H., and Myung, K. (2008). Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12411-12416.
- Motegi, A., Sood, R., Moinova, H., Markowitz, S. D., Liu, P. P., and Myung, K. (2006). Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J Cell Biol* 175, 703-708.
- Murakawa, Y., Sonoda, E., Barber, L. J., Zeng, W., Yokomori, K., Kimura, H., Niimi, A., Lehmann, A., Zhao, G. Y., Hocegger, H., *et al.* (2007). Inhibitors of the proteasome suppress homologous DNA recombination in mammalian cells. *Cancer Res* 67, 8536-8543.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.

Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.

Nojima, K., Hochegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., Orelli, B. J., Bishop, D. K., Hirano, S., Ohzeki, M., *et al.* (2005). Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer Res* 65, 11704-11711.

Ogi, T., Kannouche, P., and Lehmann, A. R. (2005). Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci. *J Cell Sci* 118, 129-136.

Okada, T., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Koyoshi, S., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Takata, M., Ogawa, O., and Takeda, S. (2002). Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage. *J Biol Chem* 277, 48690-48695.

Papouli, E., Chen, S., Davies, A. A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., and Ulrich, H. D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19, 123-133.

Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11816-11821.

Pastushok, L., Moraes, T. F., Ellison, M. J., and Xiao, W. (2005). A single Mms2 "key" residue insertion into a Ubc13 pocket determines the interface specificity of a human Lys63 ubiquitin conjugation complex. *J Biol Chem* 280, 17891-17900.

Pathmanathan, S., Krishna, M. T., Blomberg, A., Helleday, R., Kelly, F. J., Sandstrom, T., Holgate, S. T., Wilson, S. J., and Frew, A. J. (2003). Repeated daily exposure to 2 ppm nitrogen dioxide upregulates the expression of IL-5, IL-10, IL-13, and ICAM-1 in the bronchial epithelium of healthy human airways. *Occup Environ Med* 60, 892-896.

Petroski, M. D., Zhou, X., Dong, G., Daniel-Issakani, S., Payan, D. G., and Huang, J. (2007). Substrate modification with lysine 63-linked ubiquitin chains through the UBC13-UEV1A ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* 282, 29936-29945.

Pfander, B., Moldovan, G. L., Sacher, M., Hoege, C., and Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428-433.

Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* 11, 1055-1066.

Pickart, C. M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544-548.

- Pickart, C. M., and Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.
- Picologlou, S., Brown, N., and Liebman, S. W. (1990). Mutations in RAD6, a yeast gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme, stimulate retrotransposition. *Mol Cell Biol* 10, 1017-1022.
- Plosky, B. S., Vidal, A. E., Fernandez de Henestrosa, A. R., McLenigan, M. P., McDonald, J. P., Mead, S., and Woodgate, R. (2006). Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin. *EMBO J* 25, 2847-2855.
- Prakash, S., Sung, P., and Prakash, L. (1993). DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 27, 33-70.
- Quah, B. J., Warren, H. S., and Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2, 2049-2056.
- Rada, C., Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. (2004). Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* 16, 163-171.
- Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T., and Neuberger, M. S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12, 1748-1755.
- Rai, R., Peng, G., Li, K., and Lin, S. Y. (2007). DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics* 4, 99-106.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Re, D., Kuppers, R., and Diehl, V. (2005). Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 23, 6379-6386.
- Rechkoblit, O., Zhang, Y., Guo, D., Wang, Z., Amin, S., Krzeminsky, J., Louneva, N., and Geacintov, N. E. (2002). trans-Lesion synthesis past bulky benzo[a]pyrene diol epoxide N2-dG and N6-dA lesions catalyzed by DNA bypass polymerases. *J Biol Chem* 277, 30488-30494.
- Reynaud, C. A., Anquez, V., Grimal, H., and Weill, J. C. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48, 379-388.
- Robertson, K. A., Hill, D. P., Xu, Y., Liu, L., Van Epps, S., Hockenbery, D. M., Park, J. R., Wilson, T. M., and Kelley, M. R. (1997). Down-regulation of apurinic/aprimidinic endonuclease expression is associated with the induction of apoptosis in differentiating myeloid leukemia cells. *Cell Growth Differ* 8, 443-449.
- Rosenberg, B. (1977). Noble metal complexes in cancer chemotherapy. *Adv Exp Med Biol* 91, 129-150.

Sale, J. E., Calandrini, D. M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M. S. (2001). Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation. *Nature* 412, 921-926.

Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32, 3683-3688.

Sambrook, J., and D.W. Russel (2001). *Molecular Cloning- A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. ).

Saribasak, H., Saribasak, N. N., Ipek, F. M., Ellwart, J. W., Arakawa, H., and Buerstedde, J. M. (2006). Uracil DNA glycosylase disruption blocks Ig gene conversion and induces transition mutations. *J Immunol* 176, 365-371.

Schatz, D. G., Oettinger, M. A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.

Shao, G., Lilli, D. R., Patterson-Fortin, J., Coleman, K. A., Morrissey, D. E., and Greenberg, R. A. (2009). The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3166-3171.

Shiomi, N., Mori, M., Tsuji, H., Imai, T., Inoue, H., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and Shiomi, T. (2007). Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res* 35, e9.

Simpson, L. J., Ross, A. L., Szuts, D., Alviani, C. A., Oestergaard, V. H., Patel, K. J., and Sale, J. E. (2006). RAD18-independent ubiquitination of proliferating-cell nuclear antigen in the avian cell line DT40. *EMBO Rep* 7, 927-932.

Sood, R., Makalowska, I., Galdzicki, M., Hu, P., Eddings, E., Robbins, C. M., Moses, T., Namkoong, J., Chen, S., and Trent, J. M. (2003). Cloning and characterization of a novel gene, SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region. *Genomics* 82, 153-161.

Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.

Stelter, P., and Ulrich, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425, 188-191.

Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., *et al.* (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136, 420-434.

Sung, P., Prakash, S., and Prakash, L. (1990). Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2695-2699.

Suzuki, N., Ohashi, E., Kolbanovskiy, A., Geacintov, N. E., Grollman, A. P., Ohmori, H., and Shibutani, S. (2002). Translesion synthesis by human DNA polymerase kappa on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-N(2)-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). *Biochemistry* *41*, 6100-6106.

Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., and Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* *33*, 25-35.

Tamaru, J., Hummel, M., Marafioti, T., Kalvelage, B., Leoncini, L., Minacci, C., Tosi, P., Wright, D., and Stein, H. (1995). Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations. *Am J Pathol* *147*, 1398-1407.

Tang, E. S., and Martin, A. (2006). NHEJ-deficient DT40 cells have increased levels of immunoglobulin gene conversion: evidence for a double strand break intermediate. *Nucleic Acids Res* *34*, 6345-6351.

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* *19*, 94-102.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575-581.

Tsui, C., Raguraj, A., and Pickart, C. M. (2005). Ubiquitin binding site of the ubiquitin E2 variant (UEV) protein Mms2 is required for DNA damage tolerance in the yeast RAD6 pathway. *J Biol Chem* *280*, 19829-19835.

Ulrich, H. D. (2005). The RAD6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *Chembiochem* *6*, 1735-1743.

Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* *19*, 3388-3397.

Unk, I., Hajdu, I., Fatyol, K., Hurwitz, J., Yoon, J. H., Prakash, L., Prakash, S., and Haracska, L. (2008). Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3768-3773.

van der Laan, R., Uringa, E. J., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Sleddens, E., Odijk, H., Roest, H. P., de Boer, P., Hoeijmakers, J. H., Grootegoed, J. A., and Baarends, W. M. (2004). Ubiquitin ligase Rad18Sc localizes to the XY body and to other chromosomal regions that are unpaired and transcriptionally silenced during male meiotic prophase. *J Cell Sci* *117*, 5023-5033.

VanDemark, A. P., Hofmann, R. M., Tsui, C., Pickart, C. M., and Wolberger, C. (2001). Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell* *105*, 711-720.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* *70*, 523-526.

Wang, B., and Elledge, S. J. (2007). Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20759-20763.

- Watts, F. Z. (2006). Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* 5, 399-403.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perovic-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., and Muller, W. E. (2007). Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol Biol Evol* 24, 792-804.
- Wilson, P. C., de Bouteiller, O., Liu, Y. J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J. D., and Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* 187, 59-70.
- Wyatt, M. D., and Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* 19, 1580-1594.
- Xiao, W., Chow, B. L., Broomfield, S., and Hanna, M. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* 155, 1633-1641.
- Xiao, W., Lin, S. L., Broomfield, S., Chow, B. L., and Wei, Y. F. (1998). The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC-1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family. *Nucleic Acids Res* 26, 3908-3914.
- Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., *et al.* (2006). Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 7, 962-970.
- Yamashita, Y. M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G. Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and Takeda, S. (2002). RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J* 21, 5558-5566.
- Yasuda, M., Kajiwara, E., Ekino, S., Taura, Y., Hirota, Y., Horiuchi, H., Matsuda, H., and Furusawa, S. (2003). Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. *Dev Comp Immunol* 27, 159-166.
- Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M. F., Diaz, M., and Casali, P. (2001). The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity* 14, 643-653.
- Zeng, X., Winter, D. B., Kasmer, C., Kraemer, K. H., Lehmann, A. R., and Gearhart, P. J. (2001). DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol* 2, 537-541.
- Zhang, J., Zhao, D., Wang, H., Lin, C. J., and Fei, P. (2008a). FANCD2 monoubiquitination provides a link between the HHR6 and FA-BRCA pathways. *Cell Cycle* 7, 407-413.
- Zhang, S., Chea, J., Meng, X., Zhou, Y., Lee, E. Y., and Lee, M. Y. (2008b). PCNA is ubiquitinated by RNF8. *Cell Cycle* 7, 3399-3404.
- Zhao, G. Y., Sonoda, E., Barber, L. J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., *et al.* (2007). A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* 25, 663-675.